



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Ingeniería Química

“Efecto del uso de diferentes antiespumantes en la fermentación anaerobia de Mucilago de cacao CCN-51 en diversas concentraciones de la levadura Saccharomyces cerevisiae y su influencia en la producción de bioetanol.”

Trabajo de titulación previo a la obtención
del título de Ingeniera Química

Autor:

Daniela Cristina Tapia Chacón - CI: 0105088249

Director:

Mgst. Jorge Washington Delgado Noboa – CI: 0103599411

CUENCA – ECUADOR

17 de diciembre de 2019

RESUMEN

El presente trabajo de titulación tuvo como objetivo principal comparar como el uso de tres antiespumantes de diferentes características cumplen eficientemente la función de eliminar, disminuir o impedir la formación de espuma; estos son Aceite Siliconado, Alginato de Sodio y Polietilenglicol; en función de la variación de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada con valores de concentración de la misma de 3g/L, 10g/L y 20g/L; y de esta manera mejorar el proceso de fermentación. El proceso se llevó a cabo en un reactor tipo Batch Biotron GX Single Vessel inoculando microorganismos en la solución estabilizada con parámetros ya establecidos de pH, temperatura, DO y velocidad de agitación. El uso de los antiespumantes se consideró en una dosificación menor al 1% de concentración y se aplicó según se dio la generación de espuma. Se midieron parámetros físico químicos como la concentración de alcohol y el consumo de grados Brix para realizar el seguimiento del proceso de fermentación, así como la variación en los niveles de espuma para determinar la efectividad de cada antiespumante.

De esta manera se encontró que los tres antiespumantes con los que se trabajó cumplen correctamente la función de eliminación de espuma entre el 0,25% y el 1% de concentración, no obstante el aceite siliconado y el alginato de sodio llegan a interferir en el correcto desarrollo del proceso fermentativo, por otro lado el Polietilenglicol muestra resultados efectivos de eliminación de espuma sin interferir en las características físico químicas del proceso utilizando una concentración de 0,25% de manera eficiente, convirtiéndolo en la mejor opción al momento de obtener bioetanol a partir de mucilago de cacao CCN-51

Palabras clave: Mucilago de cacao. Bioetanol. Fermentación anaerobia. Antiespumantes.

ABSTRACT

The main objective of this graduation paper was to check how the use of three different antifoams with different characteristics that play efficiently the functions of eliminating, decreasing or preventing foaming; these are Silicone oil, Sodium Alginate and Polyethylene glycol; this is depending on the variation of *Saccharomyces cerevisiae* yeast used with values of 3, 10 and 20 grams per liter; and this way it will improve the fermentation process. The process was carried out in a Batch Biotron GX Single Vessel reactor, inoculating microorganisms in the stabilized solution with already established parameters of pH, temperature, Dissolved oxygen (DO) and stirring speed. The use of antifoams was considered at a dosage less than 1% concentration and was applied according to the generation of foam. Chemical physical parameters such as alcohol concentration and Brix consumption were measured to track the fermentation process, as well as variation in foam levels was measured to determine the effectiveness of each antifoam.

In this way it is found that the three antifoams with which it worked correctly fulfill the function of foam removal, however the silicone oil and sodium alginate come to interfere in the correct development of the fermentation process but the Polyethylene Glycol shows effective foam removal results without interfering with the chemical characteristics of the process using a concentration of 0,25% efficiently, making it the best choice when obtaining bioethanol from mucilage of cocoa CCN-51 type.

Key Words: Mucilage of Cocoa. Bioethanol. Anaerobic Fermentation. Antifoams.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	13
1.1. Objetivos General y Específicos	15
1.1.1. Objetivo General	15
1.1.2. Objetivos específicos	15
CAPITULO 2: CONTENIDO TEORICO	16
2.1. El cacao	16
2.1.1. Generalidades	16
2.1.2. Tipos de Cacao	16
2.1.3. Mucilago de Cacao	19
2.2. Levadura	20
2.2.1. Generalidades	20
2.2.2. Requerimientos Nutricionales	21
2.2.3. Saccharomyces cerevisiae	21
2.2.4. Factores que influyen en el crecimiento y desarrollo de la levadura	23
2.3. Bioetanol	24
2.3.1. Definición	24
2.3.2. Procesos de Obtención	24
2.4. Fermentación	26
2.4.1. Definición	26
2.4.2. Tipos de Fermentación	26
2.4.3. Factores que influyen en el proceso fermentativo	28
2.5. Espuma	29
2.5.1. Definición	29
2.5.2. Etapas de la espuma	29
2.5.3. Control de la espuma	30
2.6. Antiespumante	31
2.6.1. Definición	31
2.6.2. Tipos de Antiespumantes	31
2.6.3. Mecanismo de Acción	34
2.6.4. Factores que influyen en la acción de los antiespumantes	35
2.6.5. Aplicaciones	36
CAPITULO 3: METODOLOGÍA	38
3.1. Materia Prima	38
3.1.1. Mucilago de Cacao	38



3.1.2.	<i>Levadura</i>	39
3.1.3.	<i>Antiespumantes</i>	39
3.2.	<i>Métodos</i>	41
3.2.1.	<i>Extracción del Mucilago de Cacao</i>	41
3.2.2.	<i>Determinación de la Concentración de Azúcares</i>	44
3.2.3.	<i>Fermentación Discontinua</i>	44
3.2.4.	<i>Método de Winnick para la determinación de contenido de etanol</i>	49
3.2.5.	<i>Método de Prueba para los antiespumantes</i>	54
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....		56
4.1.	<i>Parámetros del proceso fermentativo</i>	56
4.2.	<i>Análisis y resultados obtenidos en la experimentación con 3g/L de levadura Saccharomyces cerevisiae.</i>	56
4.2.1.	<i>Análisis de datos obtenidos con aceite siliconado</i>	57
4.2.2.	<i>Análisis de datos obtenidos con Alginato de Sodio</i>	59
4.2.3.	<i>Análisis de datos obtenidos con Polietilenglicol</i>	61
4.2.4.	<i>Acción inicial de los antiespumantes</i>	63
4.2.5.	<i>Evaluación de la productividad</i>	64
4.3.	<i>Análisis y resultados obtenidos en la experimentación con 10g/L de levadura Saccharomyces cerevisiae.</i>	65
4.3.1.	<i>Análisis de datos obtenidos con aceite siliconado</i>	65
4.3.2.	<i>Análisis de datos obtenidos con Alginato de Sodio</i>	67
4.3.3.	<i>Análisis de datos obtenidos con Polietilenglicol</i>	68
4.3.4.	<i>Acción Inicial de los Antiespumantes</i>	70
4.3.5.	<i>Evaluación de la productividad</i>	71
4.4.	<i>Selección del mejor antiespumante</i>	72
4.4.1.	<i>Beneficios y desventajas de trabajar con Aceite siliconado como antiespumante</i>	72
4.4.2.	<i>Beneficios y desventajas de trabajar con Alginato de sodio como antiespumante</i>	73
4.4.3.	<i>Beneficios y desventajas de trabajar con Polietilenglicol como antiespumante</i>	74
4.5.	<i>Análisis y resultados obtenidos en la experimentación con 20g/L de levadura Saccharomyces cerevisiae.</i>	75
CAPITULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		77
BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS		80
ANEXOS		85
ANEXO I. Preparación de Reactivos para el método de Microdifusión de Conway ..		85
ANEXO II. Datos obtenidos en la experimentación con 3g/L de levadura Saccharomyces cerevisiae		87



ANEXO III. Datos obtenidos en la experimentación con 10g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
ANEXO IV. Datos obtenidos en la experimentación con 20g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95
ANEXO V. Registros fotográficos recolección de materia prima y extracción del mucilago de cacao	96
ANEXO VI. Registro fotográfico de la fermentación en el Biorreactor tipo Batch	97
ANEXO VII. Registro fotográfico del método de Winnick para la determinación de alcohol en las muestras	98
ANEXO VIII. Registro fotográfico de la formación y eliminación de espuma con los diferentes antiespumantes	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características Físico-químicas del mucilago de Cacao CCN-51	20
Tabla 2. Requerimientos Nutricionales de las Levaduras	21
Tabla 3. Composición de la Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
Tabla 4. Materiales y equipos utilizados en la obtención de mucilago de cacao CCN-51	41
Tabla 5. Materiales, equipos y reactivos para la Fermentación discontinua anaerobia	45
Tabla 6. Condiciones de operación para la Fermentación discontinua anaerobia	46
Tabla 7. Materiales, reactivos y equipos para el método de microdifusión de Conway	51
Tabla 8. Productividad del proceso fermentativo con concentración de 3g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a las 24 horas de experimentación	64
Tabla 9. Productividad del proceso fermentativo con concentración de 10g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	71
Tabla 10. Resultados Obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica sin el uso de antiespumante	87
Tabla 11. Resultados obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica con aceite siliconado como antiespumante	87
Tabla 12. Resultados obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica con alginato de sodio como antiespumante	88
Tabla 13. Resultados Obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica con Polietilenglicol como antiespumante	88
Tabla 14. Resultados obtenidos para la eliminación de espuma en la fermentación alcohólica con el uso de aceite siliconado como antiespumante	90
Tabla 15. Resultados obtenidos para la eliminación de espuma en la fermentación alcohólica con el uso de alginato de sodio como antiespumante	90
Tabla 16. Resultados obtenidos para la eliminación de espuma en la fermentación alcohólica con el uso de Polietilenglicol como antiespumante	90
Tabla 17. Resultados obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica con aceite siliconado como antiespumante	91
Tabla 18. Resultados obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica con alginato de sodio como antiespumante	91
Tabla 19. Resultados obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica con Polietilenglicol como antiespumante	92
Tabla 20. Resultados obtenidos para la eliminación de espuma en la fermentación alcohólica con el uso de aceite siliconado como antiespumante	93
Tabla 21. Resultados obtenidos para la eliminación de espuma en la fermentación alcohólica con el uso de alginato de sodio como antiespumante	93
Tabla 22. Resultados obtenidos para la eliminación de espuma en la fermentación alcohólica con el uso de Polietilenglicol como antiespumante	94
Tabla 23. Resultados obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica con Polietilenglicol como antiespumante	95

ÍNDICE DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1. Reacción de fermentación de la Glucosa.....</i>	<i>26</i>
<i>Ecuación 2. Reacción entre el dicromato de potasio y el etanol en medio ácido</i>	<i>50</i>
<i>Ecuación 3. Reacción entre el dicromato de potasio sobrante y el yoduro de potasio; liberación de yodo molecular.....</i>	<i>50</i>
<i>Ecuación 4. Reacción de cuantificación del yodo molecular mediante tiosulfato de sodio.</i>	<i>50</i>
<i>Ecuación 5. Fórmula para el cálculo de la concentración de etanol en la muestra.</i>	<i>54</i>
<i>Ecuación 6. Fórmula para el cálculo del área de un cilindro uniforme</i>	<i>55</i>
<i>Ecuación 7. Fórmula para el cálculo de la productividad de la fermentación</i>	<i>64</i>

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Tipos de Cacao.....	17
Ilustración 2. Cacao Nacional de Ecuador.....	18
Ilustración 3. Fruto de cacao CCN-51.....	19
Ilustración 4. Partes del Fruto de Theobroma Cacao L.....	19
Ilustración 5. Factores que influyen en el crecimiento de las levaduras.....	23
Ilustración 6. Esquema general de la producción de bioetanol con sus etapas principales.....	25
Ilustración 7. Proceso de Conversión de la Glucosa en Etanol.....	27
Ilustración 8. Cuadro de clasificación de los antiespumantes.....	32
Ilustración 9. Proceso de extracción de Mucilago de Cacao CCN-51.....	43
Ilustración 10. Diagrama de proceso de preparación de la materia prima.....	46
Ilustración 11. Diagrama del proceso para el acondicionamiento del reactor.....	47
Ilustración 12. Diagrama del proceso de inoculación de levadura.....	48
Ilustración 13. Diagrama del método de microdifusión de Winnick.....	53
Ilustración 14. Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 3g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
Ilustración 15. Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 3g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando Aceite Siliconado como antiespumante.....	58
Ilustración 16. Efecto del aceite siliconado en la disminución de espuma con una concentración de 3g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
Ilustración 17. Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 3g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando Alginato de Sodio como antiespumante.....	60
Ilustración 18. Efecto del Alginato de sodio en la disminución de espuma con una concentración de 3g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61
Ilustración 19. Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 3g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando Polietilenglicol como antiespumante.....	62
Ilustración 20. Efecto del Polietilenglicol en la disminución de espuma con una concentración de 3g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
Ilustración 21. Efectividad de los antiespumantes durante la primera hora de acción.....	63
Ilustración 22. . Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 10g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando Aceite Siliconado como antiespumante.....	65
Ilustración 23. Efecto del Aceite Siliconado en la disminución de espuma con una concentración de 10g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
Ilustración 24. Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 10g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando Alginato de Sodio como antiespumante.....	67
Ilustración 25. Efecto del Alginato de Sodio en la disminución de espuma con una concentración de 10g/L de Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
Ilustración 26. Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 10g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando Polietilenglicol como antiespumante.....	69

Ilustración 27. Efecto del Polietilenglicol en la disminución de espuma con una concentración de 10g/L de Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70
Ilustración 28. Efectividad de los antiespumantes durante la primera hora de acción..	71
Ilustración 29. Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 20g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando Polietilenglicol como antiespumante.....	75
Ilustración 30. Efecto del Aceite Siliconado en la disminución de espuma con una concentración de 20g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76
Ilustración 31. Resultados obtenidos en la fermentación alcohólica, consumo de grados Brix en función del tiempo, comparación en las cuatro experimentaciones	89
Ilustración 32. Resultados obtenidos en la fermentación alcohólica, producción de etanol en función del tiempo, comparación de los cuatro experimentos	89
Ilustración 33. Resultados obtenidos en la fermentación alcohólica, consumo de grados Brix en función del tiempo, comparación en las tres experimentaciones	92
Ilustración 34. Resultados obtenidos en la fermentación alcohólica, Producción de bioetanol en función del tiempo, comparación en las tres experimentaciones	93
Ilustración 35. Resultados obtenidos en la fermentación alcohólica anaerobia, comparación de la obtención de bioetanol en función del tiempo con el uso de Polietilenglicol como antiespumante con diferentes concentraciones de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95
Ilustración 36. Punto de recolección del cacao.....	96
Ilustración 37. Concentrado, Esterilización y evacuado del mucilago de Cacao CCN-51.....	96
Ilustración 38. Vista superior, vista frontal y panel de control del reactor tipo Batch	97
Ilustración 39. Antiespumantes utilizados en la fermentación alcohólica anaerobia: Aceite Siliconado, Alginato de Sodio y Polietilenglicol	97
Ilustración 40. Centrifugado de las muestras de mucilago de cacao CCN-51	98
Ilustración 41. Descongelado de las muestras que se mantenían en nitrógeno líquido	98
Ilustración 42. Rotulación de las muestras y proceso de secado a 50°C durante 2 horas.....	99
Ilustración 43. Valoración con tiosulfato de sodio 0,1N, cambio de color para determinar el viraje.....	99
Ilustración 44. Cambio en el nivel de espuma con concentración de 10g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando aceite siliconado como antiespumante	100
Ilustración 45. Cambio en el nivel de espuma con concentración 10g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando alginato de sodio como antiespumante.....	100
Ilustración 46. Cambio en el nivel de espuma con concentración 10g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando Polietilenglicol como antiespumante	101
Ilustración 47. Cambio en el nivel de espuma con concentración 20g/L de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando Polietilenglicol como antiespumante	101

Cláusula de Propiedad Intelectual

Daniela Cristina Tapia Chacón autora del trabajo de titulación "*Efecto del uso de diferentes antiespumantes en la fermentación anaerobia de Mucilago de cacao CCN-51 en diversas concentraciones de la levadura Saccharomyces cerevisiae y su influencia en la producción de bioetanol*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 17 de Diciembre de 2019



Daniela Cristina Tapia Chacón


C.I:0105088249

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio**Institucional**

Daniela Cristina Tapia Chacón, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "*Efecto del uso de diferentes antiespumantes en la fermentación anaerobia de Mucilago de cacao CCN-51 en diversas concentraciones de la levadura Saccharomyces cerevisiae y su influencia en la producción de bioetanol*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 17 de Diciembre de 2019



Daniela Cristina Tapia Chacón

C.I:0105088249

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

En la actualidad la contaminación ambiental es uno de los mayores problemas que se experimenta a nivel mundial, según el Centro de Análisis de Información sobre Dióxido de Carbono, División de Ciencias Ambientales del Laboratorio Nacional de Oak Ridge (Tennessee, Estados Unidos), en el 2014 36,1 toneladas de CO₂ fueron emitidas al medio ambiente, de las cuales 33,3% son derivadas del consumo de combustible líquido; siendo los principales países contaminantes China, Estados Unidos y la India. En el Ecuador se emitió 0,44 toneladas de CO₂ el mismo año, de los cuales aproximadamente el 85% fue derivado del consumo de combustibles líquidos.

De esta manera se genera un espacio en el desarrollo de tecnologías que permiten disminuir el uso de recursos no renovables como los hidrocarburos fósiles utilizados comúnmente como combustibles líquidos causantes de la emisión excesiva de CO₂ por su composición. Un recurso efectivo, es la implementación de energías renovables, entre las cuales se encuentra la generación de biocarburantes, estos son una mezcla de sustancias orgánicas originadas de procesos biológicos, derivados de la biomasa que pueden ser utilizados como energía en motores de combustión interna ya sea de manera exclusiva o reemplazando en cierta proporción al combustible. (Marín Quemada & San Martín González, 2013)

En el año 2017 en el Ecuador se realizó el cambio completo de la gasolina convencional conocida como Extra por la gasolina EcoPaís, este nuevo combustible tiene en su composición 95% de gasolina y 5% de bioetanol proveniente de la caña de azúcar, esta mezcla de gasolina y bioetanol permite disminuir la producción de naftas generando un efecto positivo en la balanza comercial del país, disminuyendo la contaminación ambiental y mejorando la eficiencia de los combustibles. (Astudillo & Pacheco, 2017)

Para la ejecución de este proyecto se han realizado varios estudios y análisis determinando las mejores condiciones y métodos de obtención del bioetanol, se analizó la materia orgánica a partir de la cual se obtendrá, el proceso a seguir, las condiciones de trabajo adecuadas, etc.

La materia prima utilizada en general son productos de desecho, aceite usado, excedentes agrícolas, forestales o industriales, con alto contenido de biomasa, ya que estos presentan bajos costos e incluso su eliminación podría generar contaminación, con lo que al utilizarlos en la producción de bioetanol se evitaría este inconveniente (Hernández Rueda, Mafla Yépez, Benavides Cevallos, & Ramirez Paredes, 2018)

Existen varios procesos de generación de bioetanol; cuando emplean residuos que en su composición presentan azúcares, se lleva a cabo una fermentación. Un inconveniente en este proceso es la generación de espuma ya que, si el propósito es obtener un buen rendimiento en la producción de alcohol, se debe emplear mayor cantidad de levadura, por consiguiente, más espuma se generará afectando el proceso de obtención de bioetanol. La excesiva cantidad de espuma podría afectar los procesos, los cuales deben ser detenidos para la eliminación de la espuma, impidiendo la automatización completa del proceso.

Para corregir estos problemas se utilizan compuestos químicos denominados antiespumantes, los mismos que permiten controlar la formación de espuma, disminuyéndola e incluso llegando a eliminarla. Hay varios antiespumantes que pueden ser utilizados en procesos de fermentación alcohólica anaerobia, estos son generalmente mezclas de compuestos de origen vegetal, siliconados u orgánicos, el uso de cada uno de estos dependerá de la compatibilidad que presentan con el medio. Sin embargo, no se ha determinado cuál de ellos da el mejor rendimiento en la eliminación de espuma. (Höfer, y otros, 2012)

Así, en el presente trabajo se determina qué tipo de antiespumante es el más efectivo en la eliminación de espuma en una fermentación alcohólica anaerobia en función de la concentración de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada en el proceso de obtención de bioetanol a partir de un material de desecho como es el mucilago de cacao.

1.1. Objetivos General y Específicos

1.1.1. *Objetivo General*

Comparar la disminución de espuma con el uso de tres distintos antiespumantes para la obtención de bioetanol a partir de mucilago de cacao, en función de la concentración de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada y de esta manera, mejorar el proceso de fermentación alcohólica anaerobia.

1.1.2. *Objetivos específicos*

- Determinar si el uso de un antiespumante ayuda en la fermentación alcohólica anaerobia de mucilago de cacao, eliminando el exceso de espuma formada en el proceso.
- Analizar cómo influyen los antiespumantes en los parámetros físico – químicos del bioetanol obtenido mediante la fermentación alcohólica como son la concentración de alcohol, el pH y medición de grados Brix.
- Analizar como la concentración de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada para la fermentación alcohólica anaerobia del mucilago de cacao influyen en la formación de espuma.

CAPITULO 2: CONTENIDO TEORICO

2.1. El cacao

2.1.1. Generalidades

El cacao es un fruto tropical, presenta unas flores pequeñas que se observan en las ramas y producen una mazorca que contiene granos cubiertos de una pulpa rica en azúcar (Díaz, Pinoargote, & Castillo, 2011); su nombre científico es “*Theobroma Cacao L.*”, este nombre proviene de los vocablos griegos, -*Theo*- que significa Dios y -*Broma*- alimento; de manera que se puede decir que su significado es alimento de Dioses. Este es un árbol originario de América Central y del Sur, los principales países productores de esta región son Ecuador y Brasil. (Díaz,, Pinoargote , & Castillo, 2011)

El cacao pertenece a la familia de las esterculiáceas y comprende 22 diferentes especies, las mismas que crecen bajo condiciones de bosques tropicales lluviosos, en donde la temperatura y la precipitación constante serán los factores predominantes para el crecimiento de la planta. Dependiendo de la especie, el árbol del cacao puede llegar a medir hasta los 20 m de altura, sin embargo, en cultivo se mantiene a la planta entre 4 – 8 m. El fruto de esta planta es una mazorca polimorfa, su color va desde el púrpura hasta un tono amarillo y puede llegar a medir entre 20 y 35 cm de largo, conteniendo en su interior entre 30 y 50 semillas. (Díaz,, Pinoargote , & Castillo, 2011)

2.1.2. Tipos de Cacao

A los diversos tipos de cacao que existen se los clasifican en función de las zonas en donde fueron cultivadas, además de las características organolépticas, su calidad, productividad y variedad. Entre estos los más conocidos son el Criollo, Trinitario, Forastero, Nacional de Ecuador y CCN-51 que es una especie híbrida desarrollada por el INIAP (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria). (Villagómez García , 2013)



Ilustración 1. Tipos de Cacao.

Fuente: (Quarari, 2017)

2.1.2.1. Criollo

El cacao Criollo es una variedad primitiva, se conoce que ya daba fruto en América central antes de la llegada de los colonizadores. Esta variedad de cacao se considera de “fino de aroma”; el fruto posee una corteza suave, semillas redondeadas que varían entre el color blanco y violeta y poseen un contenido menor de taninos (compuestos fenólicos); por esta razón este tipo de cacao es bastante utilizado en la elaboración de productos a base de cacao. Su cultivo se da en Países de América Central y América del Sur, como son México, Caribe, Indonesia, Nueva Guinea, Java, Ecuador, Colombia y Brasil, ocupando apenas el 10% de la producción mundial. Sin embargo, se ha intentado producir ya en países africanos para aumentar su producción mundial. (Guncay & Silva , 2018)

2.1.2.2. Forastero

Esta variedad de cacao también es conocido como Amazónico debido a que se encuentra distribuido por la Cuenca del Río Amazonas. Este tipo de cacao posee una mazorca de color amarillo, con un pequeño cuello de botella en su base, la almendra de esta especie es aplanada y tiene un color violeta o morado. Esta especie ocupa el 80% de la producción mundial e incluye el denominado Cacao Nacional de Ecuador. También se encuentran cultivos en África occidental, Brasil y al este de Asia. (Villagómez García , 2013)

2.1.2.3. Trinitario

Esta variedad de cacao es diferente y heterogéneo, fue seleccionado en Trinidad, de ahí su nombre. Posiblemente es el resultado del cruce entre el cacao Forastero y el

cacao Criollo ya que presenta características intermedias, sin embargo, posee un mejor rendimiento que éstas. Las mazorcas de esta especie pueden contener más de 30 semillas en su interior y almendras de un tono verde variable, ocupa entre el 10 y 15% de la producción mundial. (Alvarado & Valdez , 2018)

2.1.2.4. Nacional de Ecuador

El 96% del cacao tradicional ecuatoriano es un complejo formado por cacao nacional y trinitario, por esta razón esta especie se clasifica dentro de los forasteros, aunque es de tipo fino de aroma. Esta especie es un producto tradicional de Ecuador que se conoce desde hace dos siglos, su producción para la exportación hacia el mundo se realiza en la provincia del Guayas, en las zonas de la cuenca alta de los ríos Daule y Babahoyo. Al principio cuando empezó el auge de esta especie en el mundo se le denominó “cacao arriba”. Esta especie está muy predispuesta a los cambios climáticos y no es fácil de conseguir genéticamente; tiene una maduración mucho más larga y lenta que lo común; sus semillas al tener una excelente calidad y un aroma fino y suave, lo hacen un producto muy llamativo para ser utilizado solamente en la producción de chocolate de alta calidad, con un sabor especial. (Guncay & Silva , 2018)



Ilustración 2. Cacao Nacional de Ecuador

Fuente: (Anecacao, 2015)

2.1.2.5. Cacao CCN-51

El Cacao CCN-51 es una variedad del cacao ecuatoriano, se caracteriza por ser un cultivo precoz pues inicia su producción a los 24 meses de edad. Este es un clon de cacao de la doble hibridación de material genético Trinitario y Forastero de origen amazónico. (Villagómez García , 2013). No necesita de polinización cruzada para su adecuado fructificación tal como la mayoría de los clones. Entre las características de

este clon podemos citar su excelente índice de mazorca: 8 mazorcas/libra de cacao seco; excelente índice de semillas: 1.45 gr/semilla seca y fermentada; adaptabilidad: es un clon cosmopolita que se adapta a casi todas las zonas tropicales; alto porcentaje de manteca (54%), lo que lo hace cotizado. (Díaz, Pinoargote, Castillo, 2011)



Ilustración 3. Fruto de cacao CCN-51
Fuente: (Anecacao, 2015)

2.1.3. Mucilago de Cacao

Al abrir la mazorca de cacao se encuentra una almendra fresca, la cual se denomina “almendra mucilaginosa”, la misma que contiene en su interior las semillas de cacao cubiertas por una membrana blanca aromática denominada mucilago tal y como se observa en la Ilustración 4. La pulpa mucilaginosa está compuesta por células esponjosas parenquimatosas, que contienen células de savia ricas en azúcares (10-13%), pentosas (2-3%), ácido cítrico (1- 2%), y sales (8-10%). Aunque la pulpa es necesaria para la fermentación, a menudo hay más pulpa de la necesaria. Aproximadamente 40 litros de pulpa se pueden obtener de 800 kilos de semillas frescas. (Arteaga Estrella, 2013)

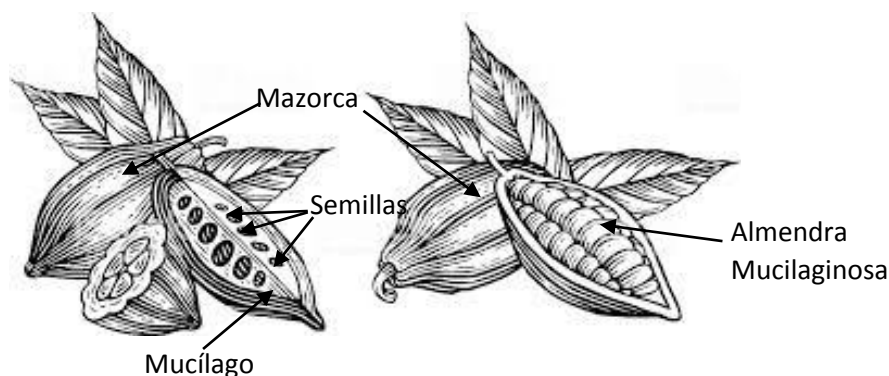


Ilustración 4. Partes del Fruto de *Theobroma Cacao* L.
Adaptado por: Autora

Al momento de la cosecha del fruto, este mucílago es desechado en la extracción de la semilla, sin darle ningún uso productivo en la mayoría de agricultores y sociedades cacaoteras del país. (Serpa Nieves & Tenesaca Castillo, 2018)

A continuación, se presenta una tabla en donde se detallan las características físico químicas del mucílago de cacao CCN-51 de la zona 6 del Ecuador, esta será la especie a estudiar.

Tabla 1. Características Físico-químicas del mucílago de Cacao CCN-51

Parámetro	Valor
<i>Total de Sólidos Solubles</i>	17,150 ± 0,860
<i>pH</i>	4,050 ± 0,004
<i>Acidez titulable (meq/L)</i>	245,250 ± 21,190
<i>Azúcares reductores totales (%)</i>	12,560 ± 1,710
<i>Azúcares totales (%)</i>	62,950
<i>Densidad (g/mL)</i>	1,060
<i>Calcio (mg/L)</i>	169,210 ± 31,040
<i>Sodio (mg/L)</i>	161,850 ± 40,410
<i>Potasio (mg/L)</i>	462,900 ± 49,690

Fuente: (Quizhpi Nieves, 2016)

2.2. Levadura

2.2.1. Generalidades

Las levaduras son un tipo de hongos unicelulares que pueden tener forma ovalada o cilíndrica, su diámetro puede variar entre 2 y 8 micras. Su principal forma de reproducción es la gemación, estos microorganismos no forman filamentos ni micelio y todas las células permanecen como una colección de células, presentándose como células individuales. Un cierto grupo de levaduras poseen una reproducción sexual conocida como apareamiento, fusionándose dos células de levaduras.

2.2.2. Requerimientos Nutricionales

Los nutrientes son sustancias que dentro de las células se convertirán en energía o parte de su estructura. En la siguiente tabla se presentan los principales nutrientes y la manera en la que los microorganismos los adquieren; (Nieto Galarza, 2009)

Tabla 2. Requerimientos Nutricionales de las Levaduras

ELEMENTO	FUNCIÓN	FUENTE
CARBONO	Elementos estructurales	Se encuentra en las D-azúcares como hexosa, fructosa, glucosa, manosa
NITRÓGENO	Promueve el crecimiento	En forma de Ion amonio. Cloruro, nitrato, fosfato y sulfato de amonio. Aminoácidos, urea.
FOSFORO	Mantiene la integridad de la pared celular	En forma de ion fosfato, como dihidrogenofosfato de potasio o por el dihidrogenofosfato disodio
AZUFRE	Constituye el 0,4% del peso seco de la levadura.	La principal fuente es el sulfato de amonio, el sulfito y el tiosulfito
POTASIO	Estimula la fermentación y la respiración	Cloruro de potasio y fosfatos mono y dipotásicos
MAGNESIO	Activa las enzimas glucolíticas	Sulfato o Cloruro de Magnesio

Fuente: (Nieto Galarza, 2009)

2.2.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Esta levadura es un tipo de microorganismo GRAS (Generally Recognized as Safe) que quiere decir que están aprobados para su uso en alimentos, esta se encuentra relacionada directamente con la producción y la cotidianidad del ser humano, su

principal uso en la industria es en la elaboración de pan y bebidas alcohólicas. Su nombre proviene de tres vocablos griegos, “*Saccharo*” que significa azúcar, “*myces*” que es hongo y por ultimo “*cerevisiae*” que es cerveza. Esta levadura es de tipo heterótrofa, es decir que no pueden sintetizar sus propios nutrientes, tiene una capacidad fermentativa elevada y obtiene la energía principalmente de la glucosa. Este es uno de los productos principales en la producción de alcohol por ser un componente rico en proteínas, puede aislarse de una manera sencilla tanto en plantas como en la tierra y sirve como fuente de proteínas y vitaminas en la alimentación de animales. (Suaréz Machin, Garrido Carralero, & Guevara Rodríguez, 2016)

En la tabla siguiente se realiza un resumen de los principales componentes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en porcentaje con la composición promedio de cada uno de ellos.

Tabla 3. Composición de la Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

COMPONENTES	PORCENTAJE (%)
Polisacáridos	32,803
Trehalosa	1,250
Ácidos nucleicos y nucleótidos	9,465
Fosfolípidos	2,203
Triglicéridos	0,625
Esteroles	0,250
Ceniza	5,840
Proteína	41,643

Adaptado de: (Suaréz Machin, Garrido Carralero, & Guevara Rodríguez, 2016)

2.2.4. Factores que influyen en el crecimiento y desarrollo de la levadura

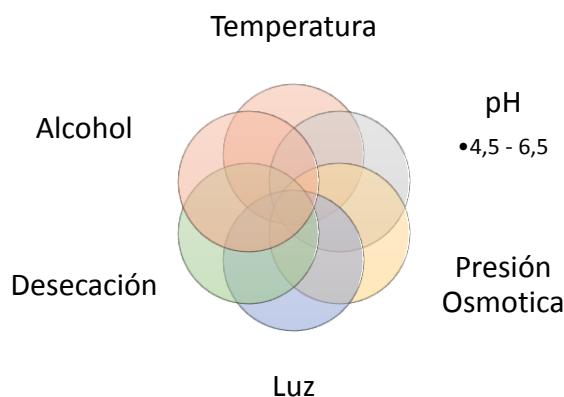


Ilustración 5. Factores que influyen en el crecimiento de las levaduras
Adaptado de: (Uribe Gutierrez, 2007)

- **Temperatura:** La mayoría de levaduras tienen una temperatura de crecimiento comprendida entre 5 y 37°, situando su valor óptimo en 28°. Cuando se trabaja con temperaturas elevadas se ocasiona una disminución en la biomasa y en el contenido de proteínas. Caso contrario, temperaturas muy bajas provoca latencia celular lo que detiene su desarrollo. (Suaréz Machin, Garrido Carralero, & Guevara Rodríguez, 2016)
- **pH:** todo microorganismo tiene un pH óptimo para su correcto desarrollo, en el caso de las levaduras esta entre el 4.5 y 6.5, estas pueden soportar medios más ácidos que otros microorganismos. (Uribe Gutierrez, 2007)
- **Presión Osmótica:** para tener un desarrollo adecuado de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es importante evitar medios hipertónicos o hipotónicos, el estrés osmótico puede disminuir el volumen celular, la velocidad de fermentación y la viabilidad celular (Uribe Gutierrez, 2007)
- **Luz:** la luz es perjudicial para los microorganismos que, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, no poseen algún pigmento que les permita usar la energía de las radiaciones. (Suaréz Machin, Garrido Carralero, & Guevara Rodríguez, 2016)
- **Desección:** este proceso inhibe las actividades que permiten el desarrollo de diversos microorganismos. (Suaréz Machin, Garrido Carralero, & Guevara Rodríguez, 2016)

- **Alcohol:** la presencia de etanol en las células puede causar una inhibición del crecimiento y disminución de la viabilidad, a partir de una concentración del 8%, por esta razón se debe terminar la fermentación con un grado alcohólico que no sea muy elevado. (Suaréz Machin, Garrido Carralero, & Guevara Rodríguez, 2016)

2.3. Bioetanol

2.3.1. Definición

El Bioetanol es un biocombustible que se obtiene por la fermentación de biomasa y materia orgánica, y su uso en los carburantes está cada vez más normalizado ya que presenta varios beneficios. Se ha señalado en varios estudios que un automóvil de gasolina funciona mejor con una mezcla de etanol sin que se tenga que modificar el motor de hasta el 20%; esta mezcla permite una combustión más rápida, lo que aumentara el rendimiento del motor en un porcentaje considerable, generando un efecto positivo para el medio ambiente, ya que se da una combustión sin emisión de azufre. (Ñuez García & García Triñanes, 2011)

2.3.2. Procesos de Obtención

La materia prima para un biocombustible puede ser materia orgánica de origen animal o vegetal incluyendo residuos o desechos orgánicos que puedan ser aprovechados energéticamente, la biomasa es una energía renovable de origen solar a través de la fotosíntesis de los vegetales. Existen diversos tipos de biomasa, los excedentes agrícolas que no sean empleados en la alimentación humana pueden ser considerados y son utilizados como materia orgánica con fines energéticos. (García Garrido, 2009-2015)

A continuación, se describe de manera general las etapas principales en un proceso de producción de bioetanol.

- a) **Dilusión:** en muchas ocasiones se necesita ajustar la concentración de nutrientes en la mezcla que se va a fermentar; generalmente se disminuye la cantidad de azúcar ya que si se trabaja con una concentración muy elevada de

ésta, las levaduras entran en un estado de latencia y no se desarrollan. (García Garrido, 2009-2015)

- b) Conversión:** Cuando se trabaja con almidones o celulosa se debe realizar un proceso para convertirlos en azúcares fermentables. Lo más común es utilizar malta o enzimas de la misma, pero también se puede realizar un proceso denominado hidrólisis ácida. (Ñuez García & García Triñanes, 2011)
- c) Fermentación:** esta es la etapa más importante para la obtención de bioetanol, ya que en esta fase se dará la conversión de los carbohidratos (siempre y cuando estos sean azúcares fermentables), en alcohol; en nuestro caso la conversión de glucosa en etanol; se realiza una fermentación alcohólica anaerobia; esta será detallada en el punto 2.4.
- d) Destilación o Deshidratación** en esta etapa se separan mediante calor los diferentes componentes líquidos de la mezcla obtenida en la fermentación, permitiendo obtener etanol casi puro. (García Garrido, 2009-2015)

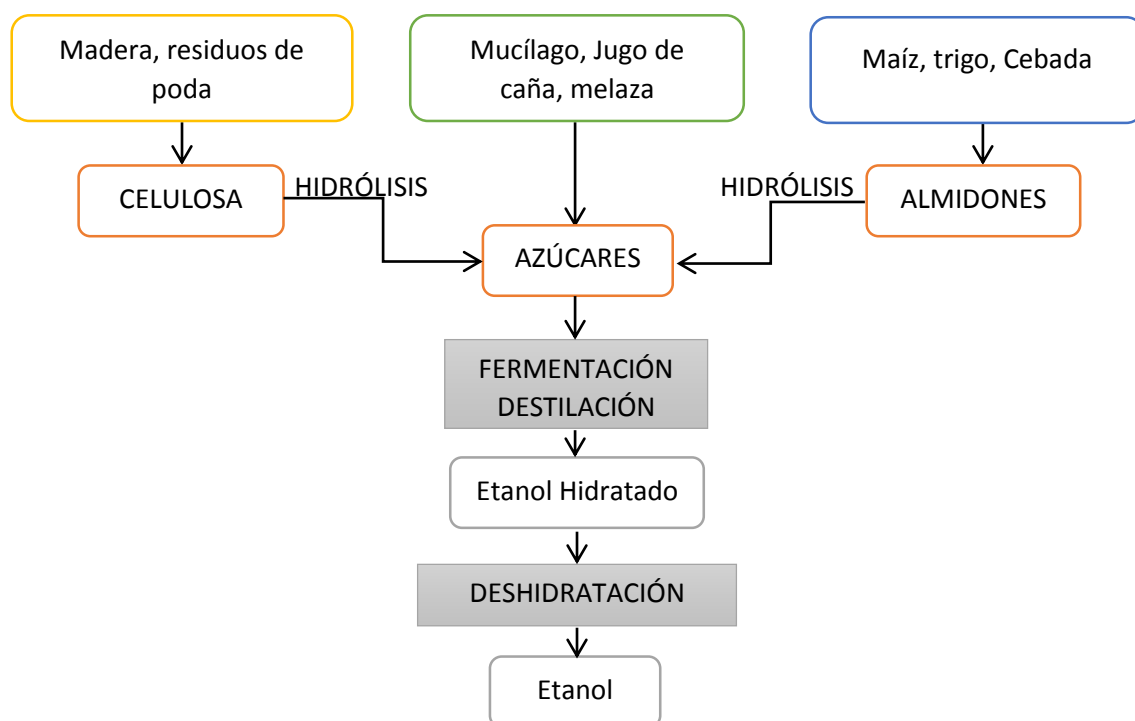


Ilustración 6. Esquema general de la producción de bioetanol con sus etapas principales

Adaptado de: (Ñuez García & García Triñanes, 2011)

2.4. Fermentación

2.4.1. Definición

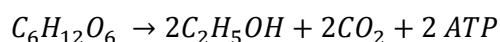
Existen varios organismos que, en ausencia de un elemento aceptor de electrones, efectúan una reacción de óxido – reducción balanceada liberando energía, a este proceso se le conoce como fermentación. Se puede definir como un proceso de biotransformación, debido a las enzimas, ya que estas actuaran como catalizadores bioquímicos presentando diversos cambios químicos en un sustrato orgánico. (Serpa Nieves & Tenesaca Castillo, 2018). Para llevar a cabo cualquier tipo de fermentación se debe conocer el sustrato, sus características físico químicas y el microorganismo idóneo. (Villagómez García , 2013)

2.4.2. Tipos de Fermentación

2.4.2.1. Fermentación Alcohólica: Es un conjunto de transformaciones bioquímicas, en ausencia de oxígeno, originado por la actividad de microorganismos que convierten los hidratos de carbono en productos finales como alcohol etílico, dióxido de carbono y moléculas de ATP. (Villagómez García , 2013)

La fermentación alcohólica es enteramente realizada por las levaduras, principalmente por la especie *Saccharomyces cerevisiae*, estas levaduras son consideradas como la principal materia prima para la elaboración de etanol. Este tipo de fermentación se da principalmente en los carbohidratos, los mismos que se desdoblan hasta convertirse en productos ricos en energía, sin reducirse completamente. Los carbohidratos, principalmente las azúcares se transforman mediante un cierto número de etapas principalmente en etanol, según la ecuación de Gay – Lussac:

Ecuación 1. Reacción de fermentación de la Glucosa



Glucosa → Etanol + Gas Carbónico + Energía

Fuente: (Villagómez García , 2013)

Este tipo de fermentación es anaerobia ya que como se ve en la ecuación 1, el oxígeno de la atmósfera no interviene ni es indispensable durante su desarrollo. (Villagómez García , 2013)

En la siguiente ilustración se muestra un gráfico en donde se puede ver la reacción de fermentación de manera simplificada:

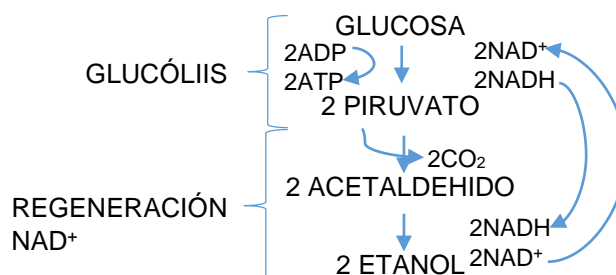


Ilustración 7. Proceso de Conversión de la Glucosa en Etanol
Adaptado de: (AGRO WASTE, 2013)

Según la ilustración 7, el proceso de fermentación conlleva varios procesos, en los cuales no solo se obtiene etanol, sino que puede obtenerse varios subproductos, esto se debe a que en la reacción de glucólisis se obtiene en primer lugar el piruvato, éste a su vez se convierte en ácido pirúvico que será el principal elemento para la formación de diversas sustancias secundarias como son: Glicerol, ácidos orgánicos, alcoholes superiores y esteres volátiles. (Urbina Vino , 2014)

- 2.4.2.2. Fermentación Acética:** esta fermentación se da durante la oxidación del alcohol provocada por la bacteria del vinagre "*Mycoderma aceti*", la misma que, a diferencia de las levaduras, requiere un suministro generoso del oxígeno del aire para su correcto desarrollo. (Bailón Neira , 2012)
- 2.4.2.3. Fermentación Láctica:** esta es la principal reacción en la obtención de leches fermentadas como el yogurt, es una fermentación eficiente y rápida. En esta fermentación el sustrato debe contener lactosa, la cual será convertida en ácido láctico y otros productos finales, en un medio adecuado la bacteria que permite la formación de ácido láctico será la dominante. (Bailón Neira , 2012)

2.4.2.4. Fermentación Cítrica: Lo más común en las fermentaciones es que se dé una oxidación parcial del azúcar presente en el sustrato, por esta razón el azúcar restante puede ser convertida en ácido. Este es el principal método de obtención del ácido cítrico en soluciones azucaradas mediante el uso de algunos mohos que permiten esta reacción en presencia de oxígeno. (Bailón Neira , 2012)

2.4.2.5. Fermentación Butírica: Este tipo de fermentación en la naturaleza se da por la presencia de microorganismos Clostridium gram positivos o bacilos, dando como resultado varios ácidos y alcoholes derivados del butano. Esta se da en las diversas enfermedades de animales como gangrena gaseosa, enterotoxemias y enfermedades neurotóxicas como tétano y botulismo. (Antolinez, Bohorquez, & Corredor, 2015)

2.4.3. Factores que influyen en el proceso fermentativo

En cualquier fermentación lo que se busca es obtener un equilibrio entre el desarrollo de las levaduras y el metabolismo de las células; existen varios factores que influyen en esto, a continuación, se describen los más importantes.

2.4.3.1. Temperatura: este es uno de los principales factores que se deben controlar en una fermentación, teniendo en consideración la evolución del calor en el proceso anaeróbico, que es relativamente pequeña. Cuando se trabaja por debajo de la temperatura óptima se da un retardo en el crecimiento de las levaduras y por consiguiente una reducción en la producción celular. Por el contrario, cuando trabajamos con temperaturas superiores puede existir un choque térmico, las células pueden entrar en una fase de estrés y se puede dar una reducción en la producción proteica. (Vital López & Larralde Corona , 2015)

La producción de calor se da cuando existe una agitación constante y por la actividad metabólica, mientras que la pérdida de calor suele suceder por la evaporación. Para el control de la temperatura se utiliza una camisa de agua que

sirve para la correcta *regulación de la temperatura*. (Vital López & Larralde Corona , 2015)

2.4.3.2. Concentración del Sustrato: la concentración de nutrientes presentes en el medio está directamente relacionado con la etapa de crecimiento de los microorganismos. Existen diversos sustratos en el medio, sin embargo, uno predomina en la etapa de crecimiento, este se conoce como sustrato limitante de la velocidad de crecimiento. Este es una fuente de carbono o nitrógeno principalmente, en algunos casos suele ser de oxígeno u otro oxidante como los nitratos, todo dependerá del tipo de fermentación. (Alvarado & Valdez , 2018)

2.4.3.3. pH: este es un factor importante ya que influye directamente en el crecimiento microbiano, la velocidad con la que se dé la fermentación y en la concentración de alcohol que se está produciendo. Las levaduras, cuando se encuentran en un medio ácido, producen etanol; mientras que, si el medio es básico, producirán glicerol. (Vital López & Larralde Corona , 2015)

2.5. Espuma

2.5.1. Definición

La espuma consiste en una masa de burbujas de un determinado gas que se dispersa en el líquido, para ser posteriormente estabilizada, a fin de que no se separen según transcurre el tiempo. Las burbujas se encuentran rodeadas de una película de líquido muy resistente que ocupa un volumen “muerto” dentro de una mezcla. Para controlar su producción dentro de un producto fluido se utilizan los aditivos llamados antiespumantes. (Gochev, Ulaganathan, & Miller, 2016)

2.5.2. Etapas de la espuma

La espuma se desarrolla en tres etapas:

- **Formación:** este periodo puede tomar desde unos pocos segundos hasta algunos minutos. La formación de espuma se puede dar por dos mecanismos

principalmente; en el primero se da un descenso en la presión o aumento de la temperatura de un gas presente ya en un líquido; el segundo se da por una agitación violenta o burbujeo, provocado por un aparato mecánico que introduce las burbujas en el seno de algún líquido. (Gochev, Ulaganathan, & Miller, 2016)

- **Maduración:** cuando la formación de la espuma está completa, sufre una degradación de manera súbita pero lentamente, en este transcurso se pueden denotar varios mecanismos; en primer lugar, se da un drenaje gravitacional del líquido, desplazándose hacia abajo; segundo, se da una succión capilar en donde el líquido se albergará en el centro de tres burbujas, dejando espacios cada vez más pequeños entre estas; y finalmente se da una difusión gaseosa intra-burbuja en donde la separación entre burbujas será cada vez más pequeña. (Gochev, Ulaganathan, & Miller, 2016)
- **Persistencia de la Espuma:** mientras la separación entre las burbujas es cada vez más delgada, la velocidad de drenaje disminuye, si el espesor se disminuye lo suficiente, se observan nuevos fenómenos y existen dos fenómenos opuestos: el primero, las fuerzas de Van der Waals tienden a atraer a las burbujas vecinas aumentando el drenaje gravitacional; y segundo, diversas fuerzas ejercen un efecto de repulsión entre las burbujas impidiendo un completo drenaje. (Cortés Gómez, 2015)

2.5.3. Control de la espuma

- 2.5.3.1. **Químico:** para controlar el crecimiento de la espuma se pueden utilizar ciertos productos químicos como antiespumantes, desespumantes o ambos; teniendo en cuenta que un desespumante se encargará de suprimir la espuma aumentando la tensión superficial del medio y un antiespumante inhibirá el crecimiento de la espuma en la fase líquida, de cierto modo los antiespumantes pueden funcionar como desespumantes, pero no viceversa. (Cortés Gómez, 2015)

2.5.3.2. Físico: este método se basa en el uso de un control mecánico de la espuma, incluyendo en los equipos un separador entre la fase gaseosa y la fase líquida en la alimentación. Este tipo de control reduce la probabilidad de formación de espuma y en muchos casos disminuye el uso de controles químicos durante los procesos. (Cortés Gómez, 2015)

2.6. Antiespumante

2.6.1. Definición

Los antiespumantes son agentes tensoactivos que actúan por medio de tensiones superficiales intermedias para lograr desestabilizar la espuma y liberar el aire retenido en la emulsión. La función de los antiespumantes es evitar la formación y destruir las burbujas, permitiendo procesar mejor el producto, consiguiendo propiedades óptimas del mismo, además de otros beneficios como, por ejemplo, evitar la pérdida de producto por desbordamiento. Los agentes antiespumantes, tradicionalmente eran sistemas líquidos de un solo componente o soluciones homogéneas derivadas de aceites vegetales, sin embargo, hoy en día se ha implementado el uso de aceites minerales y de formulaciones más complejas, incluyendo las sales acuosas de derivados de fosfátidos obtenidos de diferentes plantas. (Gochev, Ulaganathan, & Miller, 2016)

2.6.2. Tipos de Antiespumantes

En la actualidad los antiespumantes están diseñados para satisfacer distintas necesidades y exigencias, incluyendo la eficacia óptica, la fácil aplicación en la industria, dosis convenientes, baja volatilidad y su seguridad desde el punto de vista toxicológico y ecológico. Hoy en día la mayoría de antiespumantes no son sustancias simples sino, compuestos los cuales se clasifican en diferentes grupos como se observa en el siguiente cuadro de clasificación:

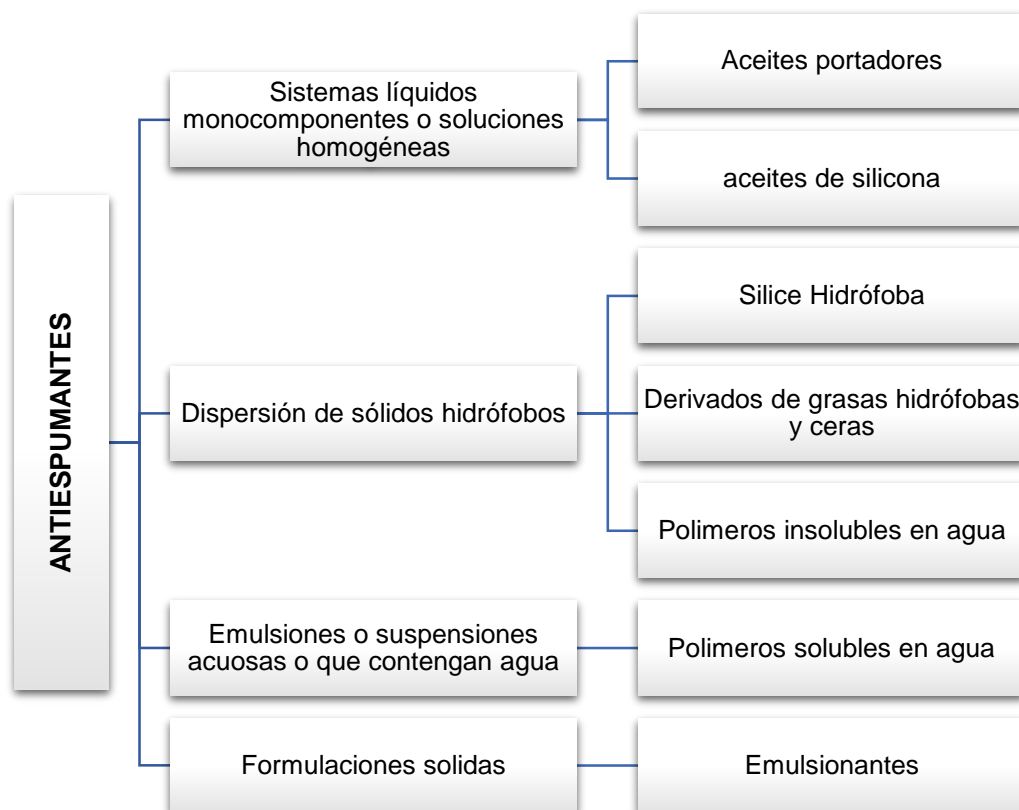


Ilustración 8. Cuadro de clasificación de los antiespumantes

Adaptado de: (Gochev, Ulaganathan, & Miller, 2016)

Y sus componentes funcionales se pueden dividir en cuatro grupos: Aceites portadores, ingredientes activos, sustancias anfífilas y agentes de acoplamiento y estabilizantes. (Gochev, Ulaganathan, & Miller, 2016)

Según esto se clasifica a los antiespumantes de la manera siguiente:

2.6.2.1. Aceites portadores: Los aceites portadores considerados más importantes son aceites minerales parafínicos y nafténicos insolubles en agua; así como aceites vegetales; de ricino, de soja o de maní. Estos aceites permiten controlar la espuma de una manera eficaz y en cierta medida también muestran una actividad sinérgica. (Gochev, Ulaganathan, & Miller, 2016)

2.6.2.2. Aceites de silicona e inhibidores de espuma de silicona: estos son antiespumantes eficientes de manera particular por su baja tensión superficial, estabilidad térmica, inercia química e insolubilidad total en agua. Este tipo de antiespumante es muy utilizado en la industria del petróleo,

particularmente en la separación de la mezcla gas natural – petróleo. Los aceites de silicona más importantes son los dimetilpolisiloxanos, sin embargo, estos muestran poca actividad inhibidora de la espuma por sí mismos. Por esta razón la mayoría de los antiespumantes de silicona no son aceites de silicona puros, sino formulaciones de silicona suplementadas con partículas sólidas hidrófobas finamente divididas que son las que confieren la propiedad de inhibición de la espuma. (Höfer, y otros, 2012)

- **Modo de Aplicación:** estos se suministran en forma de dispersiones anhidras en aceite de silicona. Estas mezclas son aceitosas y turbias, algunas veces tienen consistencia de una pasta, sin embargo, lo más común es usar sistemas acuosos en emulsiones del 5 al 50%. (Abdollahi, Moosavian, & Vatani, 2005)

2.6.2.3. Sílice hidrófoba: Este tipo de antiespumantes se han desarrollado recientemente, son una innovación en el campo, en los últimos años se ha podido perfeccionar varios métodos que le permiten a este material la propiedad hidrófoba, los más importantes son:

- Rociar la sílice con aceite de silicona a una temperatura entre 250-350°C
- Tratamiento con vapores de haluro de silicio en autoclave
- Dispersión de la sílice en un aceite siliconado con temperatura elevada y recuperación por centrifugación
- Haciendo reaccionar hidrogel de silicona en alcohol, aminas grasas o cera.

La sílice precipitado amorfo es el material más adecuado para la elaboración de antiespumantes por su bajo costo y excelente rendimiento. (Höfer, y otros, 2012)

2.6.2.4. Derivados de grasas hidrófobas y ceras: en este tipo de antiespumantes se puede encontrar diversos materiales: ésteres de ácidos grasos de alcoholes mono y polifuncionales; amidas de ácidos grasos y sulfonamidas; ceras de hidrocarburos parafínicos; mono, di y tri ésteres de ácido fosfórico de alcoholes grasos de cadena corta y larga; alcoholes grasos naturales o

sintéticos de cadena corta y larga; jabones de ácidos grasos de cadena larga insolubles en agua; alcoholes grasos perfluorados. (Gochev, Ulaganathan, & Miller, 2016)

2.6.2.5. Polímeros insolubles en agua: existen varias sustancias poliméricas que presentan la propiedad de inhibir la espuma; aquí se incluyen resinas alquílicas, copolímeros de acetato de vinilo y de metacrilato; también incluyen los poli-propilenglicoles y óxido de propileno de alto peso molecular; los productos de adición de óxido de butileno o a-epóxidos de cadena larga con alcoholes polivalentes muestran los mismos efectos que los polímeros de óxido de propileno. (Gochev, Ulaganathan, & Miller, 2016)

2.6.2.6. Polímeros solubles en agua: Este tipo de antiespumantes contienen polietilenglicol y copolímeros de polipropilenglicol, estos generalmente se presentan como aceites, soluciones acuosas o emulsiones a base de agua. La efectividad de estos antiespumantes se basa en las buenas propiedades de sus componentes como dispersantes, estos son adecuados cuando existen inconvenientes de depósitos. (Tarek Kakhia, 2009)

2.6.2.7. Emulsionantes: la principal función de un emulsionante es asegurar una rápida distribución de los ingredientes activos a lo largo de una fase acuosa, algunos surfactantes ya enumerados en la categoría anfifílicas cumplen este papel hasta cierto punto. Sin embargo, también se pueden emplear surfactantes no iónicos hidrófilos fuertes como son los esteres de sorbitán etoxilados. (Höfer, y otros, 2012)

2.6.3. Mecanismo de Acción

Para la correcta desestabilización de una espuma se requiere reducir la tensión superficial del líquido, esto afecta la pared líquida que existe entre el líquido y el gas denominada como lamela, de forma que se expande o se rompe; es importante también

manipular la viscosidad del líquido como un co-mecanismo de rompimiento de la espuma. Este rompimiento generalmente ocurre vía tres mecanismos:

2.6.3.1. Adelgazamiento de la película: ocurre un adelgazamiento de la parte superior de la espuma a causa de la gravedad, las burbujas se vuelven rígidas a punto tal que las paredes de las mismas pierden fuerza y la burbuja se colapsa. (Cortés Gómez, 2015)

2.6.3.2. Redistribución del tamaño de las burbujas: cuando el tamaño de las burbujas no es uniforme, existe una difusión del gas presente en las mismas desde las pequeñas a las más grandes, cuando entran en contacto entre ellas, por la diferencia de presión entre ellas. (Cortés Gómez, 2015)

2.6.3.3. Ruptura de la película: esto ocurre cuando una burbuja colapsa, ya que las partículas aquí formadas pueden colisionar con las burbujas más cercanas causando que éstas también se revienten, causando una reacción en cadena potenciando el rompimiento de toda la espuma. (Cortés Gómez, 2015)

2.6.4. Factores que influyen en la acción de los antiespumantes

- **Viscosidad:** Con la alta viscosidad del antiespumante, generalmente cuando estos están hechos a base de aceite, se hace muy difícil la propagación de la película precursora para que de esta manera el antiespumante actúe sobre la mezcla. Una pérdida significativa del rendimiento del antiespumante se relaciona con la reducción del tamaño de los glóbulos del mismo a lo largo del tiempo, una vez que esto pasa, el antiespumante no cambia significativamente sus características iniciales. (Abdolahi, Moosavian, & Vatani, 2005)
- **Partículas hidrófobas:** cuando se agregan estas partículas al antiespumante pueden separar de manera más eficiente las gotas del líquido del gas, esto aumenta el rendimiento del antiespumante ya que permite una mejor inserción de las gotas del antiespumante en la mezcla líquido – gas. Además de esto permite aumentar la viscosidad efectiva del antiespumante, lo que ayuda a

prevenir la emulsificación excesiva y la reducción de tamaño. (Abdollahi, Moosavian, & Vatani, 2005)

- **Concentración del Antiespumante:** Particularmente en sistemas de dos o más componentes se ha demostrado que la concentración del antiespumante afecta directamente en la inhibición de la espuma. El líquido insoluble de menor tensión superficial que se encuentra en la mezcla será el que actúe como inhibidor (Abdollahi, Moosavian, & Vatani, 2005). La concentración con la que se trabaje dependerá del tipo de antiespumante y en el proceso que se lo utilice, por ejemplo: cuando en un biorreactor se utiliza *Eschericia Coli- K* para la fermentación, con aceite siliconado como antiespumante, se debe trabajar con concentraciones inferiores a 250ppm para que este no reduzca la actividad específica de la reacción; se empieza a presentar defectos en un reactor de mezcla perfecta con *Schizosaccharomyces pombe* con Polietilenglicol800 como antiespumante empieza con concentraciones superiores al 1%; y en el caso de trabajar con *Saccharomyces cerevisiae* con cualquier antiespumante se ve un descenso en la producción de proteína recombinante si la concentración del antiespumante es superior al 1%. (Routledge , 2012)

2.6.5. Aplicaciones

Los antiespumantes industrialmente se emplean en un sinnúmero de procesos, a continuación, se detallan los más importantes:

- Cuando se utilizan como un ingrediente en alimentos están destinados a evitar el derrame o la efervescencia en la preparación.
- Se utilizan en muchos procesos y productos industriales como pulpa de madera, papel, pintura, tratamiento de aguas residuales, petróleo, herramientas de corte, etc.

- También se pueden vender productos antiespumantes para aliviar la hinchazón, por ejemplo, el Alginato de calcio es muy utilizado con este propósito. (Tarek Kakhia, 2009)
- Para la producción de lipasas recombinantes a partir de glicerol se utiliza Antifoam 204, este es una mezcla orgánica de poliéteres en dispersión, en una concentración máxima de 0,15%. (Loango Chamorro, 2015)
- En una investigación en donde se trabaja en la producción de proteína recombinante en un cultivo de ovario de hámster chino se determinó que las mejores condiciones de eliminación de espuma se dan cuando se trabaja con una concentración de 0,01 a 0,07% (p/v) de antiespumante. (Handrick, Ebert, Hesse, & Paul, 2017)
- En la producción de ácido cítrico a partir de levaduras se puede utilizar aceites vegetales, aceite de silicona, poliglicoles y aceite mineral como agentes antiespumantes, estos generalmente se utilizan en una concentración de 0,01 al 1% dependiendo si alguno de estos componentes interfiriese en el proceso de fermentación.

CAPITULO 3: METODOLOGÍA

El presente trabajo de titulación es de tipo experimental – explorativo; en él se realiza un estudio sobre la obtención de bioetanol en una fermentación alcohólica anaerobia usando mucilago de cacao CCN-51 como fuente de sustrato, este proceso de tipo discontinuo, se llevará a cabo en un reactor de tipo “Batch” Biotron GX Single Vesselo de capacidad 2 litros; equipo situado en el laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción (Centro Tecnológico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca). Se opera bajo condiciones establecidas de pH, temperatura y velocidad de agitación determinadas por Guncay y Silva, 2018.

Para la mejora del proceso se analizará el cambio del mismo con el uso de tres diferentes antiespumantes, con la variación de la concentración de la levadura *S. Cerevisiae* basándonos en las cantidades mínimas y máximas determinadas por Serpa y Tenesaca, 2018. Se realizará una medición de la disminución en la altura de la espuma, también se medirá la concentración de alcohol y la disminución de los grados Brix durante el proceso.

3.1. Materia Prima

3.1.1. Mucilago de Cacao

El cacao a utilizar en la presente investigación será del tipo CCN-51, como se encuentra detallado en el capítulo 2, este es un tipo de cacao híbrido de maduración temprana, presentando alta productividad y de fácil obtención. De esta variedad se obtiene el mucilago de cacao con características conocidas, que fueron obtenidas por (Quizhpi Nieves, 2016) “mediante métodos de absorción atómica y espectrofotometría UV-Visible.

3.1.1.1. Georreferencia de la Recolección del Cacao. El cacao CCN-51 se recolecta en la Zona 6 del Ecuador, provincia del Guayas, cantón Naranjal, En el recinto Puerto Inca; Vía a la costa, carretera E25 en la Hacienda Margara, la georreferencia es 1°57'27.7"S 79°35'32.1"O, aproximadamente a 3horas 20minutos de la Universidad de Cuenca.

3.1.2. Levadura

La levadura que se utilizará en esta experimentación es la *Saccharomyces cerevisiae*, de la marca “Levapan”, esta es la más común utilizada en panadería. Este es un producto bio-orgánico, se presenta en bloques de 500g empacados en lotes de 50 unidades. Este producto se debe mantener en refrigeración a temperaturas entre 2-5 °C dándole una vida útil de 30 días. Es importante adquirir el producto siempre en el mismo lugar y de ser posible del mismo lote. (Serpa Nieves & Tenesaca Castillo, 2018)⁷

3.1.3. Antiespumantes

En esta investigación se utilizarán tres diferentes antiespumantes en función de su factibilidad y facilidad de adquisición; también se toma en cuenta la clasificación que da el “*Codex Alimentarius*” (Codex Alimentarius, 2018) para aditivos de alimentos ya que se requiere que los productos químicos a utilizar no afecten significativamente el proceso de fermentación y el desarrollo normal de las levaduras; dentro de este código se encuentran 7 compuestos que constan como antiespumantes de los cuales se escoge tres en función de nuestra clasificación para realizar una comparación de sus características. En la clasificación se puede encontrar 4 tipos de antiespumantes, Soluciones homogéneas o sistemas monocomponentes, dispersión de sólidos hidrófobos, emulsiones y formulaciones sólidas. Así también, en el Codex Alimentarius se encuentra un valor de dosis máxima recomendada que se toma en cuenta; sin embargo, se decide tomar como base investigaciones sobre antiespumantes en fermentación, para la obtención de proteínas recombinantes a partir de Levadura *Saccharomyces cerevisiae* en donde se considera una dosis máxima de estos compuestos del 1%, ya que en concentraciones superiores se ve afectado el rendimiento del proceso. (Routledge , 2012)

- **Aceite Siliconado:**

El primer antiespumante a ser considerado será un aceite de silicona que es una solución líquida homogénea, este se encuentra comercialmente con el nombre “Aceite

De Silicona 350 Wacker Belsil Dm” en una presentación de 1litro de contenido. Este aceite de silicona es una mezcla de siliconas que presenta como base la dimetilpolisiloxano, es un líquido viscoso y blanquecino con una baja solubilidad en agua; según el Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2018) el dimetilpolisiloxano debe estar presente en una concentración máxima de 10mg/Kg en alimentos. Este antiespumante es adquirido en la empresa comercializadora de productos químicos “Freire Mejia Cia. Ltda.”.

- ***Alginato de Sodio***

Este compuesto es muy conocido en la industria alimenticia por ser un eficiente emulsionante con características antiespumantes, de manera que es seleccionado para las experimentaciones para comprobar su efectividad como antiespumante. Los alginatos son los componentes principales de las paredes celulares de las algas, teniendo como función principal dar elasticidad, rigidez y flexibilidad a las mismas. Estos tienen diversas aplicaciones, esto se debe a que presentan cuatro propiedades principales muy importantes; posee una efectiva habilidad como espesante al ser disueltos en agua; gran capacidad de retención de agua; habilidad de la de un gel; facilidad para formar una película. Los alginatos, en su forma natural, se presentan como una mezcla de sales de cationes de Ca^+ , Mg^+ y Na^+ ; de estos el Alginato de Sodio es el catión más estable y que presenta las mejores características. (Avendaño Romero , Lopez Malo , & Palou, 2013).

Comercialmente, el Alginato de sodio tiene una presentación en sólido seco de color blanquecino de 250g; según el Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2018), este no tiene una dosis máxima, se puede utilizar hasta la factibilidad de su uso, no obstante, cuando se trabaja en concentraciones entre 2 y 2,5% este compuesto tiende a formar un gel mucho más viscoso que con concentraciones de 1% (Raymundo, Ramos Ramírez, Cruz Orea, & Salazar Montoya); este es adquirido en la empresa comercializadora de productos químicos “Freire Mejia Cia. Ltda.”.

- **Polietilenglicol**

El Polietilenglicol es un poliéter, según su estructura química; este es un líquido viscoso y transparente, al ser soluble en agua permite su uso en medios acuosos, por otro lado, es químicamente inerte, lo que le da estabilidad térmica. Este es el principal componente de los antiespumantes a base de polímeros solubles en agua conocidos comercialmente como Antifoam 204; utilizados en la producción de proteína recombinante. Según el Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2018) este compuesto tiene una dosis máxima de 1000 mg/Kg en bebidas en general. En esta investigación se utiliza Polietilenglicol P200 de baja densidad de la casa comercial “Merck”; este viene en una presentación de 5 litros.

3.2. Métodos

3.2.1. Extracción del Mucilago de Cacao

3.2.1.1. Materiales y Equipos Los materiales y equipos utilizados para la recolección del cacao CCN-51 y la posterior extracción del mucilago de cacao se encuentran detallados a continuación en la tabla 4.

Tabla 4. Materiales y equipos utilizados en la obtención de mucilago de cacao CCN-51

MATERIALES	EQUIPOS
<i>Cuchillos</i>	Termómetro
<i>Recipientes plásticos</i>	Cocina a gas
<i>Recipientes estériles de 1 galón</i>	Mezclador
<i>Jarras plásticas con medidas</i>	Tamiz Telar
<i>Ollas de acero inoxidable</i>	Refractómetro

Adaptado de: (Serpa, Tenesaca, 2018)

3.2.1.2. Procedimiento

Para la obtención del mucilago de cacao CCN-51, lo primero será determinar la zona geográfica para la recolección del cacao, a continuación, se lleva a cabo una

clasificación de las mazorcas, si es que se encuentran maduras serán recolectadas, caso contrario se descartarán; la madurez del cacao se ve reflejado en el cambio de coloración del fruto. Las mazorcas recolectadas serán transportadas para ser procesadas.

Para la extracción del mucilago de cacao en primer lugar se lavan todas las mazorcas recolectadas y después son cortadas, a las mazorcas que se encuentren en buenas condiciones se les retirarán las venas y se almacenarán, las mazorcas que se encuentren en malas condiciones serán desechadas. Se coloca el fruto de las mazorcas almacenadas anteriormente en una mezcladora para realizar un ablandamiento durante 20 minutos, a continuación, el fruto será llevado a un tamiz de tela para poder separar el mucilago de las pepas de cacao utilizando varios pisos, las pepas serán llevadas nuevamente a la mezcladora para realizar una doble extracción. Se miden los parámetros físico químicos del mucilago: pH, grados Brix y volumen; se procede a realizar una concentración del mucilago de cacao para poder obtener los grados Brix necesarios que serán de 17° Bx; después de esto se realiza la esterilización del mismo. Una vez terminado este proceso se procede a la rotulación y almacenamiento del mucilago a una temperatura de -18°C.

3.2.1.3. Diagrama del procedimiento de extracción de mucilago de cacao.

El procedimiento de extracción del mucilago de cacao CCN-51 se muestra a continuación en la ilustración 9.

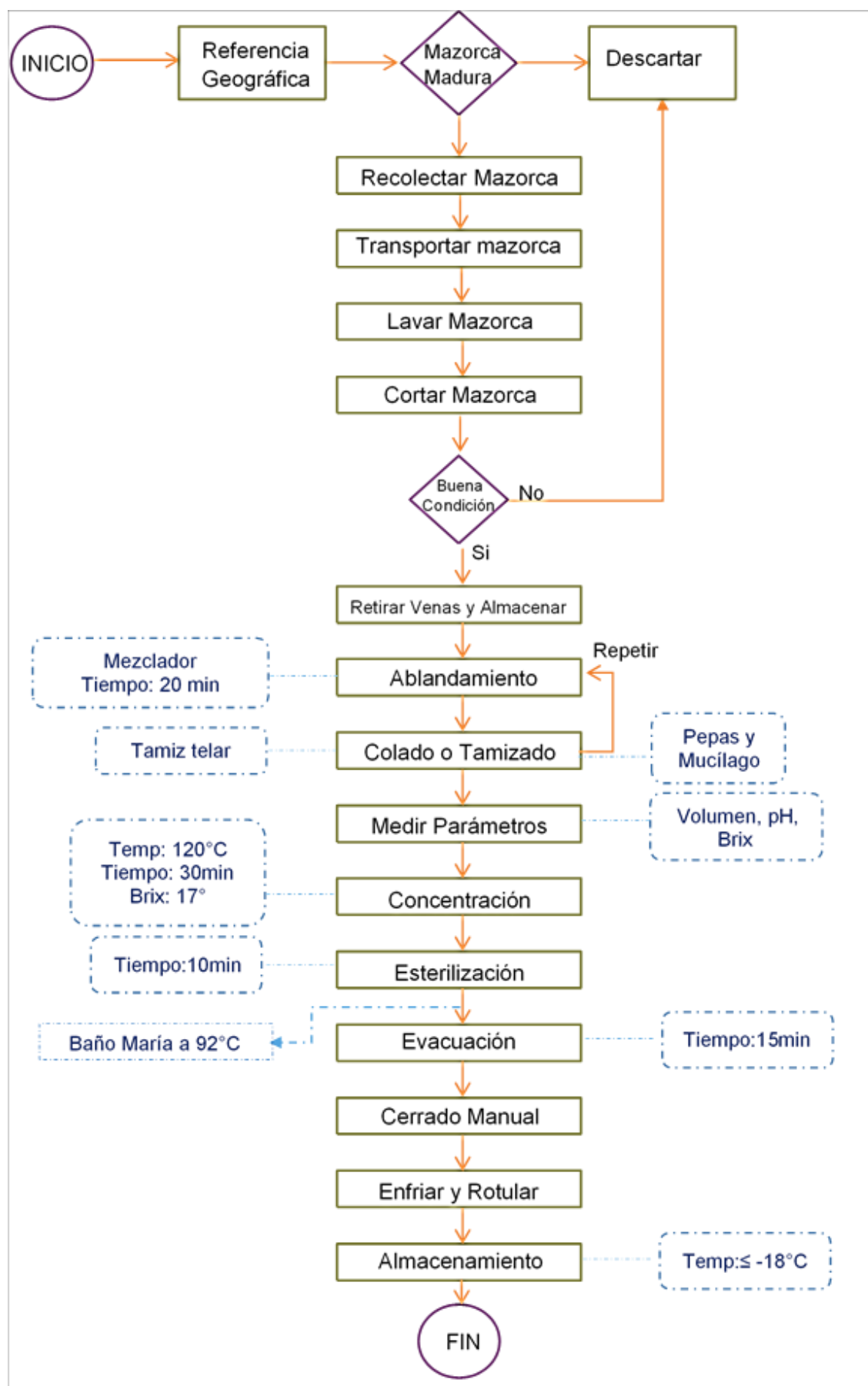


Ilustración 9. Proceso de extracción de Mucilago de Cacao CCN-51

Elaborado por: Autora

3.2.2. Determinación de la Concentración de Azúcares

Los azúcares son una fuente importante de energía que nutre a las células, en su mayoría, los carbohidratos están formados principalmente por carbono, hidrogeno y oxígeno en una proporción $(CH_2O)_n$, de ahí su nombre. Entre los azúcares más importantes se encuentra la glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa, lactosa, y trehalosa. (Cuamatzi Tapia & Melo Ruiz , 2006)

Para determinar la concentración de azúcares disueltas en una solución se utiliza un refractómetro que permite medir valores entre 0 y 100, este equipo se basa en el principio de difracción de la luz, por el cual, cuando aumenta la densidad de una sustancia, el índice de refracción aumenta de manera proporcional. La escala de medición de estos equipos nos mostrará el porcentaje de concentración del total de sólidos solubles presentes en el agua, conocidos como grados Brix ($^{\circ}\text{Bx}$), sin embargo, se toma esta medida como el porcentaje de concentración del total de azúcar disuelta, ya que esta se encuentra en una mayor proporción. Cada Brix representará 1 gramo de sacarosa por cada 100 gramos de solución.

3.2.3. Fermentación Discontinua

Una fermentación discontinua o por lotes, quiere decir que se colocará dentro del biorreactor la carga total de la solución de nutrientes inoculados, dejándolo llevar a cabo durante el tiempo de retención, que será el tiempo necesario para que se dé una fermentación completa del sustrato alimentado. En los procesos comerciales este se interrumpe al final de la fase logarítmica y principio de la fase de latencia o muerte. Lo positivo de este método es que posee instalaciones simples y es muy conocido, sin embargo, su principal defecto es que requiere un mayor número de recursos. (Reyes Campoverde, 2017)

La fermentación se realizará en un reactor de tipo batch o por lotes “Biotron GX Single Vessel” capacidad 2 litros; equipo situado en el laboratorio de Energía e Ingeniería de la Reacción (Centro Tecnológico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca), se realizará una fermentación de tipo anaerobia en una atmósfera inerte.

3.2.3.1. Materiales, Equipos y Reactivos

A continuación, se presenta una tabla en donde se encuentran detallados los materiales, equipos y reactivos utilizados en el proceso de fermentación discontinua.

Tabla 5. Materiales, equipos y reactivos para la Fermentación discontinua anaerobia

Materiales	Equipos	Reactivos
Recipiente de acero	Reactor tipo batch BIOTRON	Mucílago de cacao CCN-51
Probeta de 100ml	GX Single Vessel	HCl 1N
	Refractómetro	NaOH 1N
	Cocineta a gas	Levadura
		Agua destilada
		Gas Nitrógeno

Adaptado de: (Serpa Nieves & Tenesaca Castillo, 2018)

3.2.3.2 Procedimiento

A) Preparación de la materia prima

La materia prima principal en la fermentación es el mucilago de cacao CCN-51, obtenido a partir del procedimiento 3.2.1. descrito anteriormente, el mismo que se encuentra a temperatura de congelación, por ello se debe realizar el siguiente proceso:

- Descongelar el mucilago, retirar del congelador y colocarlo en refrigeración durante tres días antes de realizar el experimento.
- Medir la concentración de azúcares del sustrato, se debe trabajar con un valor de 17°Bx; en el caso de obtener un valor superior se debe adicionar agua destilada hasta llegar al valor deseado.
- Calentar el mucilago en un recipiente metálico en la cocineta a gas, para adecuar el mucilago a una temperatura superior a la de fermentación (+2° mínimo).
- Medimos el volumen de materia prima a utilizar con una probeta, con un valor de 2 litros para cada experimentación y a continuación agregamos este mucilago en el reactor, que será el sustrato de nuestra fermentación.

A.1. Diagrama de la preparación de la materia prima en la fermentación discontinua

En la ilustración 10 se presenta un diagrama que indica la preparación de la materia prima usada para la fermentación discontinua anaerobia.

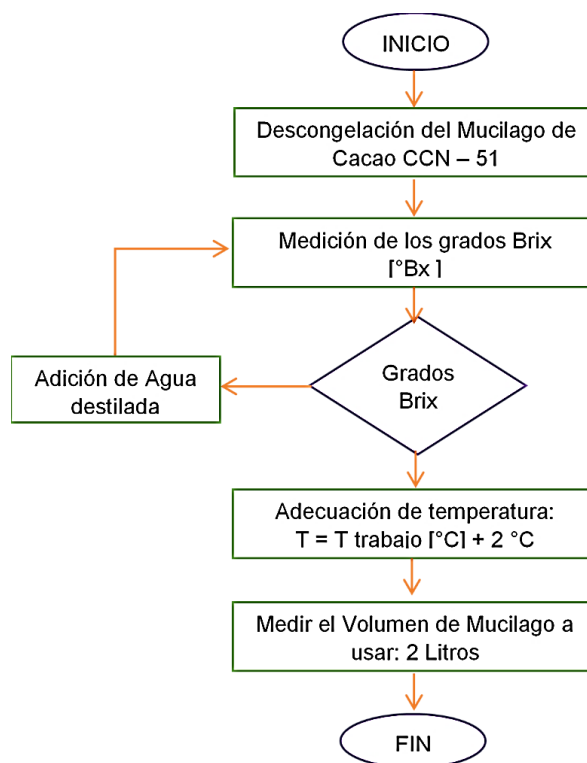


Ilustración 10. Diagrama de proceso de preparación de la materia prima

Adaptado de: (Alvarado & Valdez , 2018)

B) Acondicionamiento del reactor

En primer lugar, se debe preparar el reactor, para ello se realiza la conexión de las diferentes mangueras encargadas del sistema de enfriamiento, mangueras de alimentación de reactivos y sensores de pH, temperatura, DO, pertenecientes al reactor; así como se realizará el ensamble del mecanismo para el agitador.

A continuación, se seleccionan los parámetros a trabajar, establecidos por (Guncay & Silva , 2018), los cuales están indicados en la siguiente tabla:

Tabla 6. Condiciones de operación para la Fermentación discontinua anaerobia

pH	4
Temperatura (°C)	35
Velocidad de Agitación (rpm)	250
DO	0

Fuente: (Guncay & Silva , 2018)

Se debe tomar en cuenta que el parámetro oxígeno disuelto (DO) va a variar durante todo el proceso de fermentación, este empieza con un valor elevado entre 9 y 11, e irá disminuyendo progresivamente hasta llegar a un valor de 0.

B.1. Diagrama para el proceso de acondicionamiento del reactor

El proceso de acondicionamiento del reactor se presenta en la ilustración 11:

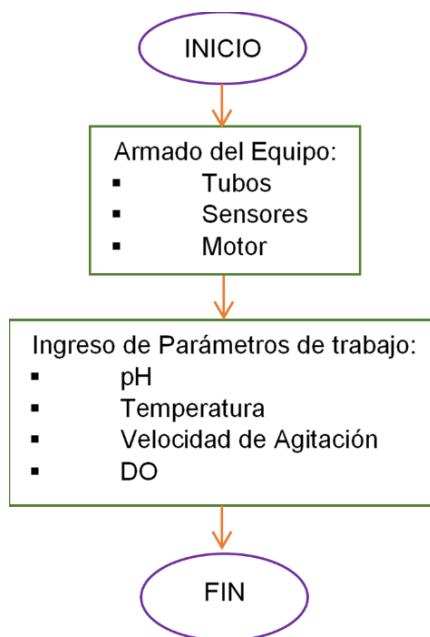


Ilustración 11. Diagrama del proceso para el acondicionamiento del reactor.

Elaborado por: Autora

C) Inoculación de la levadura

Se adicionan 2 litros de mucilago de cacao en el reactor; cuando todos los parámetros han sido seleccionados empieza la corrida, o puesta en marcha del reactor, esto hará que se active la agitación del reactor y el sistema de enfriamiento, ya que el mucilago entra al reactor a una temperatura superior a la de trabajo.

El acondicionamiento de los parámetros de fermentación es automático, el equipo se encargará de regularlos; excepto el pH, este será ajustado manualmente con la adición de NaOH 1N para subirlo o con HCl 1N para descenderlo.

En el momento que se llega a los parámetros de trabajo se procede con la inoculación de la levadura; se pesa la cantidad de levadura, la que varía con cada experimentación en función de la cantidad de sustrato con la que se está trabajando, sin considerar la

humedad de la misma en el peso. A continuación, se toma una muestra del sustrato ya en el equipo y en esta se diluye uniformemente la levadura y se adiciona esta mezcla al reactor. Finalmente, se acciona el flujo de nitrógeno, esto permite trabajar en una atmósfera inerte (libre de oxígeno), esto permite la obtención de alcohol.

C.1. Diagrama de proceso de inoculación

El proceso para la inoculación de la levadura en la fermentación se muestra en la ilustración 12.

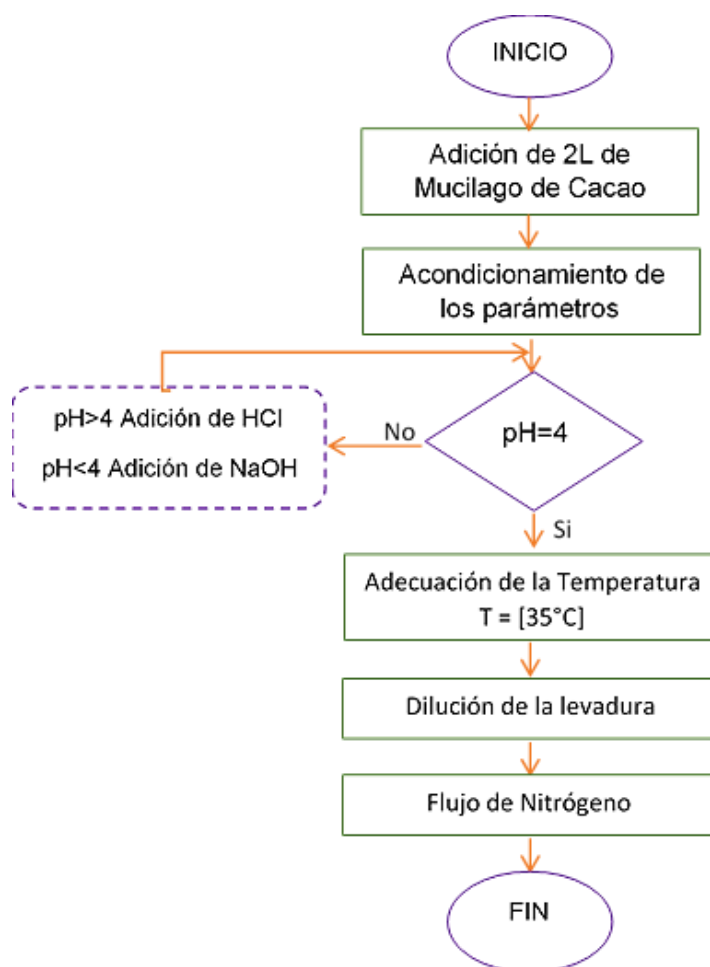


Ilustración 12. Diagrama del proceso de inoculación de levadura.

Elaborado por: Autora

D) Fermentación

Se da una fermentación por lotes; los mismos que se basan en los resultados obtenidos anteriormente por (Serpa Nieves & Tenesaca Castillo, 2018) cada experimento tendrá una duración aproximada de 24 horas, la experimentación termina cuando se llegue a un valor de grados Brix constante y la levadura entra a la fase de latencia. La medición

de los grados Brix se realiza a las 2 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas; dependiendo de cómo avance el proceso fermentativo.

Se realizarán experimentaciones con el mínimo y el máximo de levadura con los que se puede trabajar que son 3g/L y 10g/L; una vez con cada antiespumante. Además se realizará una experimentación adicional, en función del mejor antiespumante, para trabajar con 20g/L que según (Orellana, 2018), teóricamente es la mayor cantidad de levadura con la que se puede obtener la mayor concentración de alcohol.

3.2.4. Método de Winnick para la determinación de contenido de etanol

Para la determinación de la concentración de alcohol presente durante el proceso fermentativo se utilizará el método de Winnick, mediante la técnica, fundamento y procedimiento de microdifusión de Conway, se utilizan cajas bipetri en lugar de celdas de Conway; con esto se analiza la producción de bioetanol en función del tiempo y el consumo de azúcares disueltos en el sustrato para determinar si existe una influencia significativa en la producción de alcohol por el uso de los antiespumantes.

3.2.4.1. Fundamento del método de microdifusión de Conway

Este método permite determinar la presencia de alcohol en muestras biológicas, es muy utilizado por ejemplo en la determinación de la presencia de alcohol en sangre. Sin embargo, también permite determinar diferentes sustancias oxidantes como amoníaco, nitrógeno, urea, ácido láctico, adenosina, aminas, acetona, ácido láctico, glucosa, etanol y otros alcoholes. (Fernandez N, 1950)

El método se basa en una reacción de óxido-reducción en la que el etanol (C_2H_5OH) reacciona con el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en medio ácido. Cuando esta reacción es equilibrada y se completa da un cambio en la coloración del compuesto, pasa de un anaranjado brillante a un color que va desde el ocre hasta el azul. De esta manera se puede determinar la cantidad de dicromato de potasio que no reacciona mediante espectrofotometría o por titulación con tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$), en donde el

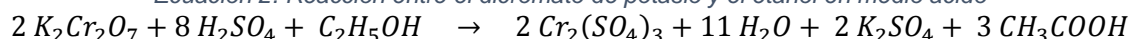
almidón funcionara como indicador de la presencia de (I_2) en la reacción. (Hernández Mora, 2015)

Cuando una sustancia que es volátil se mezcla en solución con un solvente puro, en la misma atmósfera, el solvente tiende a disolver la sustancia volátil que quedará disuelta en la atmósfera y se llegará al equilibrio. Cuando no se puede trabajar con un solvente puro se puede utilizar un reactivo que permitirá que la sustancia deje de ser volátil, transformándola en una sustancia susceptible a ser valorada de manera numérica. (Hernández Mora, 2015)

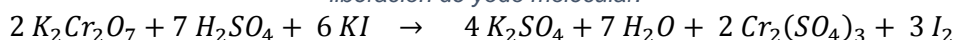
La caja bipetri consta de dos cámaras; en una de las cámaras se encuentra el alcohol generalmente disuelto en solución y debido a la alta tensión de vapor del alcohol se genera la difusión de esta hacia la segunda cámara o compartimiento de la celda en donde se encuentra dicromato de potasio en ácido sulfúrico, éste será el encargado de convertir el alcohol en ácido acético de manera continua. (Abril Alvarez, 2014)

El exceso de dicromato de potasio quedará en el medio sin reaccionar y éste será el que se mida con yoduro de potasio, de acuerdo a la siguiente reacción:

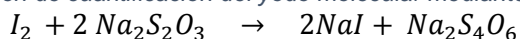
Ecuación 2. Reacción entre el dicromato de potasio y el etanol en medio ácido



Ecuación 3. Reacción entre el dicromato de potasio sobrante y el yoduro de potasio; liberación de yodo molecular.



Ecuación 4. Reacción de cuantificación del yodo molecular mediante tiosulfato de sodio.



Fuente: (Hernández Mora, 2015)

En esta reacción, el carbonato de potasio será utilizado como agente liberador de etanol y se utiliza almidón como indicador, determinando la cantidad de yodo obtenido mediante la reacción del mismo con tiosulfato de sodio. (Hernández Mora, 2015)

3.2.4.2. Materiales, reactivos y equipos

Tanto los materiales, equipos y reactivos se describen a continuación en la tabla 7 de manera detallada.

Tabla 7. Materiales, reactivos y equipos para el método de microdifusión de Conway

Materiales	Reactivos	Equipos
Balones de Aforo (25ml, 100ml)	Dicromato de Potasio	Secador GANDER
Vasos de Precipitación 100ml	$K_2Cr_2O_7$ (0,4N) en Ácido	MTN
Pipetas Volumétricas (1ml, 2ml, 5ml)	Sulfúrico H_2SO_4 (10N)	Centrifuga 80-3
Pera para pipeta	Tiosulfato de Sodio $Na_2S_2O_3$ (0.1N)	Balanza BOECO
Piseta	Yoduro de Potasio KI (3N)	BWL 61
Bureta de 25ml	Carbonato de Potasio K_2CO_3	
Soporte Universal	o de Sodio Na_2CO_3 al 20%	
Pinza para bureta	Solución de Almidón	
Varilla		
Cajas Bipetri con separación de plástico		

Adaptado de: (Serpa Nieves & Tenesaca Castillo, 2018)

3.2.4.3. Procedimiento del método de microdifusión de Conway

Para la correcta determinación de alcohol con este método se requiere que las muestras se encuentren en un rango de 20 a 225mg de contenido de alcohol, para ello se realizarán diluciones de 2:100 para una confiabilidad de los resultados.

Primero se debe tomar una muestra de 7ml del sustrato en tubos plásticos, después se lleva esta muestra a la centrifuga a 4000rpm durante 10 min. Terminado el proceso de centrifugación se tomará el líquido sobrenadante de la muestra para realizar las diluciones.

A partir de estas diluciones se realiza el siguiente procedimiento que describe los pasos a seguir para el método de microdifusión de Conway:

- Colocar 2ml de la muestra previamente diluida en el compartimiento A de la caja bipetri.

- b. Medir 2ml de carbonato de potasio y colocarlo en el compartimiento A de la caja bipetri, mezclar los reactivos por rotación suavemente.
- c. Medir 1ml de dicromato de potasio 0.4N preparado en ácido sulfúrico y colocarlo en el compartimiento B de la caja bipetri.
- d. Cerrar la caja bipetri herméticamente, utilizando cinta aislante.
- e. Colocar las cajas bipetri en el secador a una temperatura de 50°C o 125°F durante al menos 2 horas.
- f. Transcurrido este tiempo se procede a retirar el cierre hermético de las cajas bipetri para destaparlas.
- g. Colocar 1ml de yoduro de potasio 3N y 3 gotas de indicador de almidón en la cámara B de la caja bipetri.
- h. Mezclar bien los reactivos en la cámara B de la caja bipetri.
- i. Valorar la solución con Tiosulfato de Sodio 0,1N con agitación constante hasta que se dé el viraje de color a azul brillante.
- j. Registrar el volumen de tiosulfato de sodio consumido.
- k. El ensayo se realizará por triplicado para corroborar los resultados

Nota: observar el color de la cámara B de la caja bipetri; se procede a titular la muestra cuando al haber transcurrido las 2 horas en el desecador, el reactivo presenta un color verde, verde amarillento u ocre. Si la cloración es azul se debe descartar la muestra y se procede a realizar una dilución más.

3.2.4.4. Diagrama del procedimiento de microdifusión de Conway

El procedimiento completo para la determinación de la concentración de etanol en una muestra, esta detallado en la ilustración 13 mediante un diagrama de flujo.

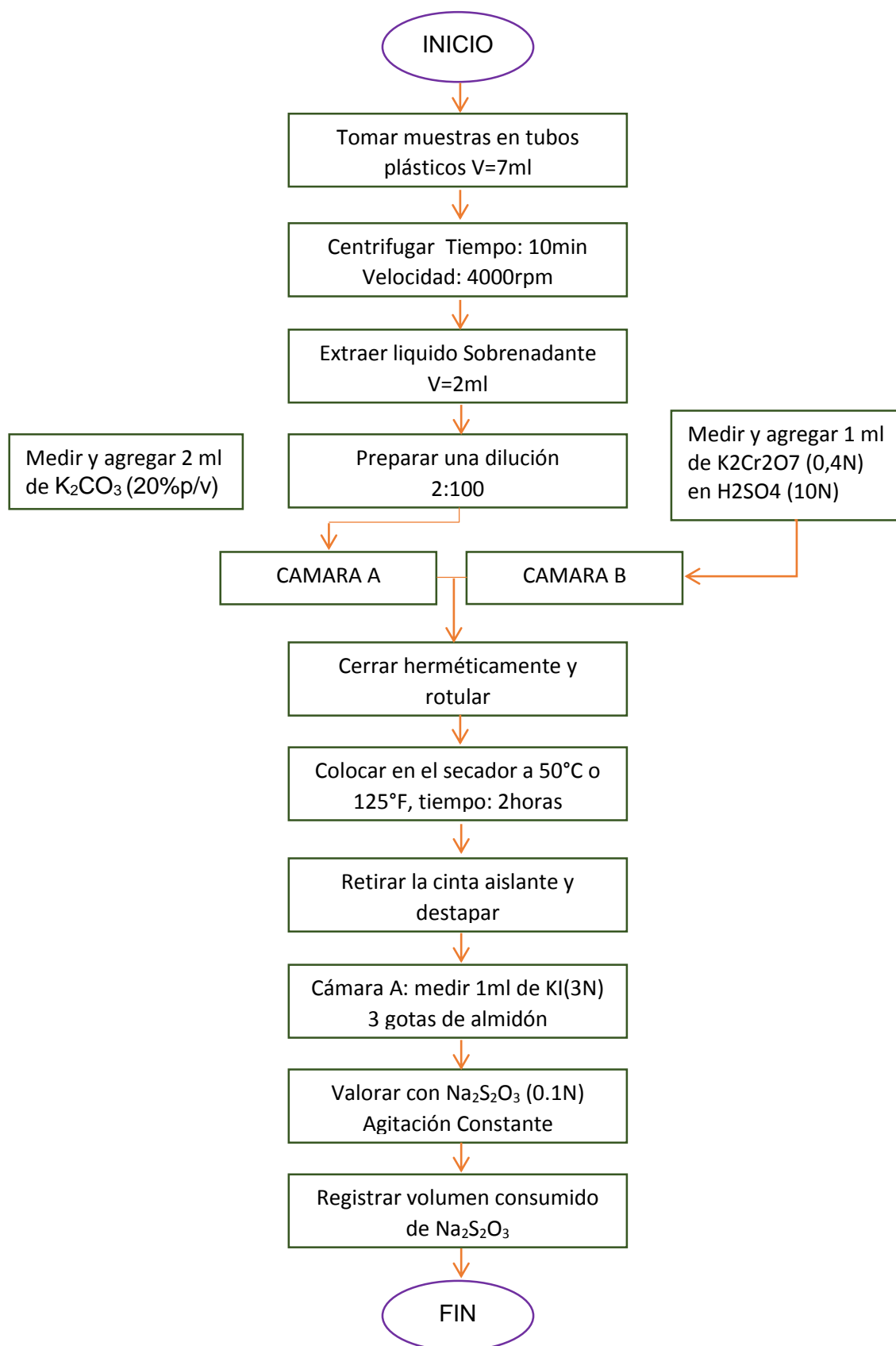


Ilustración 13. Diagrama del método de microdifusión de Winnick

Adaptado de: (Serpa Nieves & Tenesaca Castillo, 2018)

3.2.4.5. Determinación de la concentración de etanol y su expresión numérica

Para realizar el cálculo de la concentración de etanol en la muestra se encuentra la diferencia numérica entre el volumen de tiosulfato de sodio consumido en la valoración de la muestra blanco y la muestra problema que se está analizando; esta diferencia se multiplica por el factor 11,51 y la normalidad del titulante, de esta manera obtendremos el valor en mg de etanol por 1ml de muestra, o que es lo mismo gramos de etanol en un litro de muestra.

Ecuación 5. Fórmula para el cálculo de la concentración de etanol en la muestra.

$$\text{Etanol} \left(\frac{g}{l} \right) = \frac{N * (V_b - V_m)}{VM} * 11,51$$

Fuente: (Abril Alvarez, 2014)

En donde:

N: Normalidad del tiosulfato de sodio

V_b: Volumen de Na₂S₂O₃ consumido en la titulación del blanco (ml)

V_m: Volumen de Na₂S₂O₃ consumido en la titulación de la muestra problema (ml)

VM: Volumen de muestra utilizada en la experimentación (2ml)

11,51: En base a la reacción Redox, este valor es el resultado de dividir el peso molecular de etanol para 4.

Se debe tomar en cuenta a la hora de realizar los cálculos que el valor obtenido en este deberá ser multiplicado según las diluciones que se realizaron previamente.

3.2.5. Método de Prueba para los antiespumantes

Para analizar la medida de efectividad del antiespumante se realizará la medición directa del volumen de espuma que se vaya generando; para ello se mide la altura o nivel de la espuma con una regla en centímetros y se multiplicará por el área del reactor, así, se obtiene el volumen de espuma en centímetros cúbicos (cm³) o mililitros (ml).

La medida de la altura de la espuma se empieza a tomar a partir de las 6 horas de fermentación o cuando la espuma llega a su nivel máximo; este será el tiempo 0 para la determinación de formación de espuma, considerándolo como la hora crítica.

En este momento se inicia con la dosificación de los antiespumantes, se realizan 2, 4 o más aplicaciones del antiespumante con el que se está trabajando hasta llegar a una concentración de 1%, en función de cómo vaya actuando el mismo sobre el nivel de la espuma. Se mide el volumen de reducción de la espuma a los 5, 10, o 30 minutos después de su aplicación.

Para el cálculo del área del reactor se tomará la medida del diámetro del mismo y con esta se aplicará la fórmula para el cálculo del área de un cilindro uniforme:

Ecuación 6. Fórmula para el cálculo del área de un cilindro uniforme

$$A = \frac{\pi * D^2}{4}$$

En donde:

D: Diámetro del reactor = 13,5 cm

A: Área del reactor

$$A = \frac{\pi * (13cm)^2}{4}$$

$$A = 132,7 \text{ cm}^2$$

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Parámetros del proceso fermentativo

El estudio partió de los resultados obtenidos por Serpa y Tenesaca en 2018, en donde se demuestra que las condiciones más adecuadas para obtener una mejor producción de alcohol son un pH de 4, temperatura de 35°C, DO de 0 y una agitación constante de 250rpm; además se determinó que la mínima concentración de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que permite obtener una óptima cantidad de alcohol son 3g/L. Serpa y Tenesaca también plantean encontrar cual sería la mayor cantidad de levadura con la que se podría trabajar, dando un valor de 8g/L de manera experimental sin embargo, según los resultados del método simplex se podía llegar a trabajar hasta con 22g/L de levadura pero se presentaban inconvenientes al momento de aumentar la concentración de levadura ya que esta aumenta la formación de espuma. Por lo cual se decide hacer el análisis del efecto de los antiespumantes variando la concentración de levadura *Saccharomyces cerevisiae* con 3 y 10 g/L; a partir de los resultados que se obtengan con estas concentraciones se plantea realizar una experimentación con 20g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando el antiespumante con las mejores características.

4.2. Análisis y resultados obtenidos en la experimentación con 3g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Se realiza un total de 4 experimentaciones con 3g/L de levadura; una experimentación sin el uso de ningún antiespumante y una experimentación para cada uno de los antiespumantes, en donde se analizan los resultados obtenidos de pH, Brix, oxígeno disuelto y concentraciones de alcohol, para determinar el efecto de cada uno de los antiespumantes en el proceso. También se realizó la medida de espuma para analizar la efectividad de cada antiespumante.

A continuación, se muestra una gráfica en donde se observa el descenso de grados Brix y la producción de alcohol en función del tiempo cuando se trabaja con 3g/L de levadura en la primera experimentación sin el uso de antiespumantes.

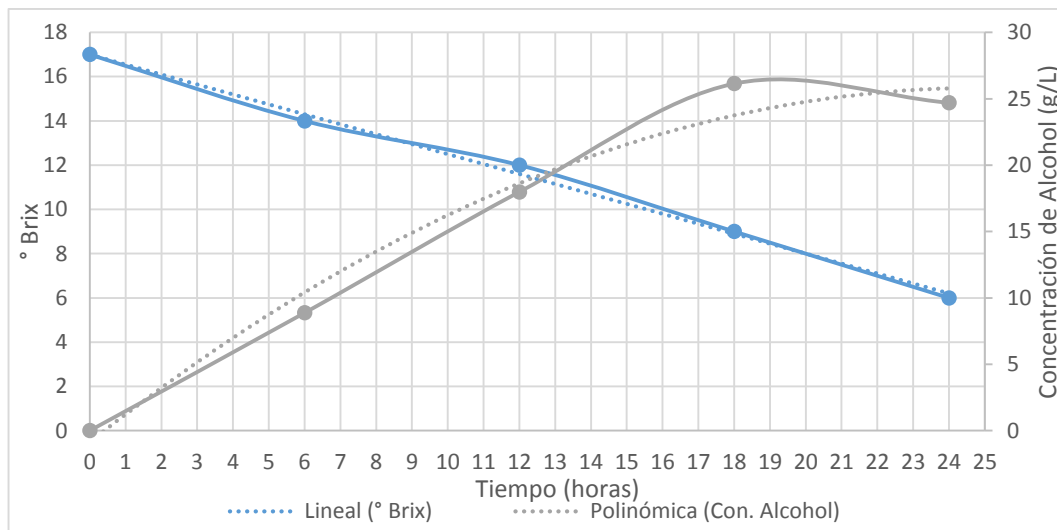


Ilustración 14. Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 3g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Elaborado por: Autora

Como se puede observar en la ilustración 14., el descenso de los grados Brix se da de una manera lineal comenzando con un valor de 17° hasta llegar a un valor de 6° a las 24 horas. También se observa que la producción de alcohol llega a un valor máximo de 26g/L aproximadamente a las 19 horas y a continuación empieza la fase de latencia de las levaduras al ya no existir suficiente alimento para las mismas. De esta manera se toma este comportamiento como base para el estudio y así determinar la influencia de cada antiespumante en el proceso fermentativo.

4.2.1. Análisis de datos obtenidos con aceite siliconado

La segunda experimentación que se hizo fue una fermentación de 2L de mucilago de cacao con una concentración de 3g/L de levadura en la que se agregó aceite siliconado como antiespumante a partir de las 6 horas aproximadamente de fermentación ya que este será el punto crítico en la formación de espuma. En la ilustración 15 se muestra los resultados obtenidos en la fermentación empleando un total de 20ml de antiespumante colocado en distintos momentos de la fermentación.

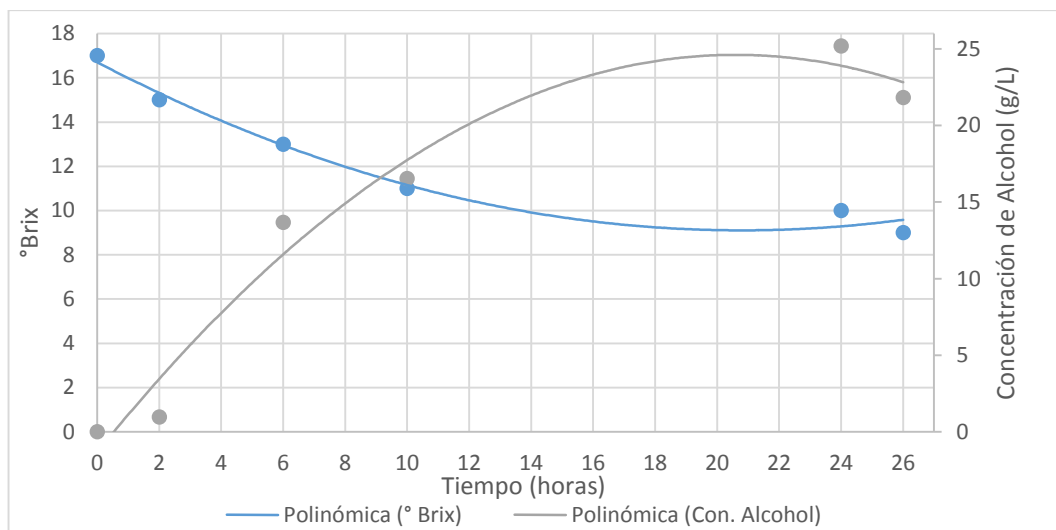


Ilustración 15. Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 3g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando Aceite Siliconado como antiespumante.

Elaborado por: Autora

Se puede observar que la concentración de grados Brix no desciende más allá de 9° con una tendencia polinómica eso nos indica que la silicona produce cierta inhibición en este consumo. La producción de alcohol llega a su máximo entre las 22 y 23 horas y es cuando empieza la fase de latencia de las levaduras dando una concentración máxima de bioetanol de aproximadamente 25g/L. El uso de este antiespumante no influía directamente en los valores de pH ni DO; pero si cambia el color del sustrato ya que la mezcla de aceite siliconado es de color blanco lechoso y como no se disuelve completamente tiende a aclarar la solución.

A continuación, se observa la efectividad del antiespumante en la disminución de espuma graficado en la ilustración 16, en donde se encuentra la relación entre el volumen de espuma en función del tiempo y también la concentración de antiespumante en función del tiempo.

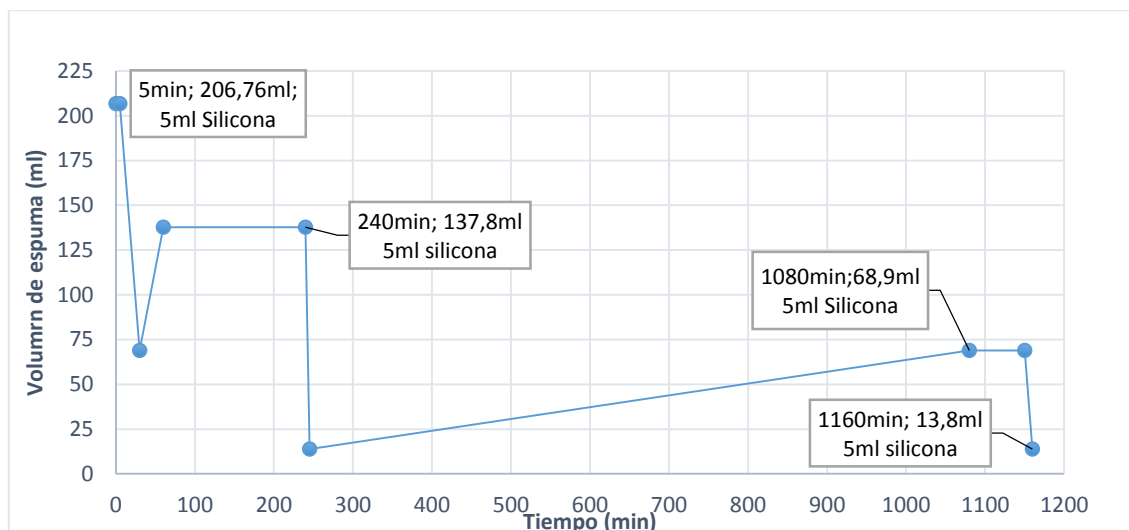


Ilustración 16. Efecto del aceite siliconado en la disminución de espuma con una concentración de 3g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Elaborado por: Autora

En la gráfica se observa el comportamiento de la espuma en función de la cantidad de antiespumante que se ha ido agregando. Como se dijo anteriormente el antiespumante se empieza a agregar en la hora crítica de formación de espuma y podemos determinar que con los primeros 5ml de aceite siliconado el volumen de espuma disminuye notablemente desde aproximadamente 210ml hasta 70ml de espuma, sin embargo, después de 30 minutos vuelve a subir y a la primera hora (60min) obtiene un valor constante de aproximadamente 140 cm³ y se mantiene constante hasta el minuto 240; por lo cual se agrega nuevamente 5ml de antiespumante logrando descender la espuma a menos de 20cm³ en el minuto 245 pero vuelve a subir el volumen de espuma a 70cm³ por lo que se decide agregar 5ml de antiespumante sin notar cambios en la espuma por lo que se debe agregar 5 ml más llegando a la máxima cantidad de antiespumante que se planteó utilizar disminuyendo nuevamente a un valor de 20 cm³ de espuma permaneciendo constante.

4.2.2. Análisis de datos obtenidos con Alginato de Sodio

La tercera experimentación se realiza para analizar la influencia del Alginato de sodio como antiespumante en una fermentación alcohólica anaerobia con una concentración de levadura *Saccharomyces cerevisiae* de 3g/L.

En la ilustración 17 se puede observar el consumo de grados Brix y la concentración de alcohol que se va generando en función del tiempo.

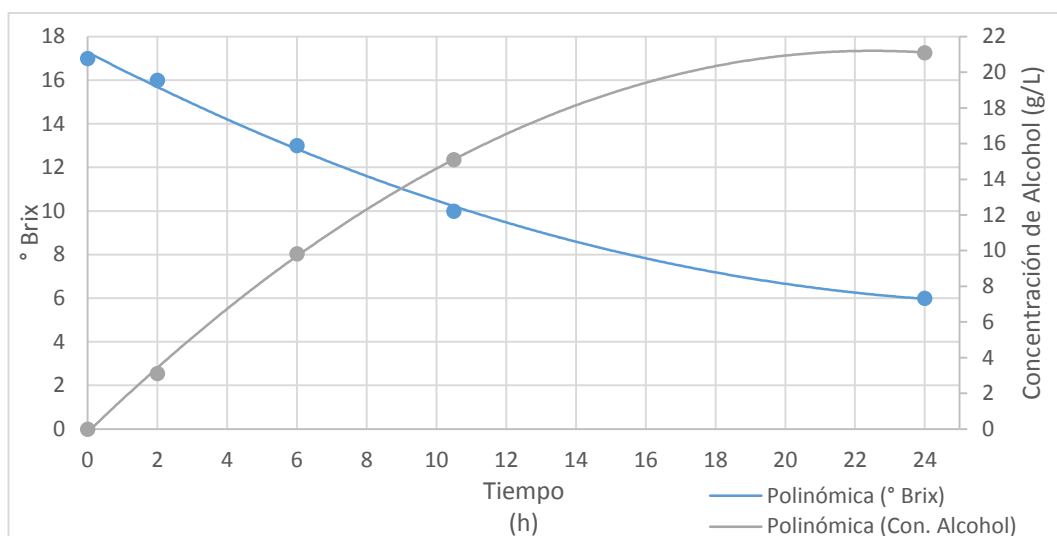


Ilustración 17. Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 3g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando Alginato de Sodio como antiespumante

Elaborado por: Autora

El Alginato de sodio influye directamente en la producción de alcohol ya que se llega a un valor máximo de 21g/L a las 24 horas de fermentación generando una disminución en la velocidad de fermentación. Los grados Brix descienden hasta los 6° de manera normal.

El Alginato de sodio también altera el pH del medio subiéndolo ligeramente a 4,03 en cada aplicación de este reactivo. El Alginato de sodio se encuentra como un polvo blanquecino, para agregar al medio y que haya una dilución completa del mismo necesita ser licuado con el sustrato; sin embargo, no se obtiene una solución homogénea.

En la ilustración 18 se encuentra la relación entre la adición de este antiespumante y la disminución de espuma, los dos en función del tiempo para determinar la efectividad del alginato de sodio como antiespumante.

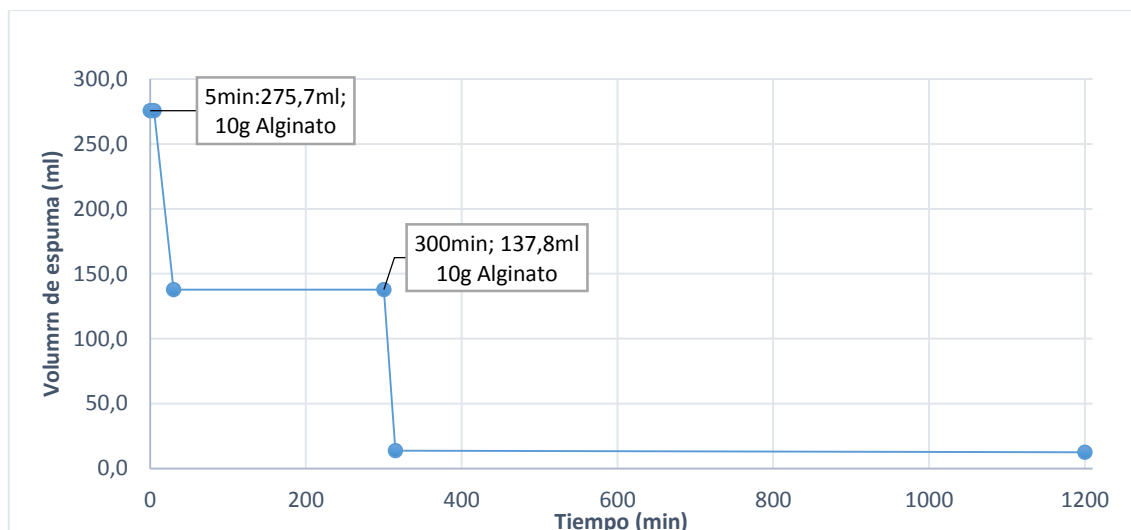


Ilustración 18. Efecto del Alginato de sodio en la disminución de espuma con una concentración de 3g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Elaborado por: Autora

A la hora crítica de la fermentación la espuma alcanza un nivel de aproximadamente 275cm³ por lo que se procede a agregar 10 gramos de alginato de sodio ya que este reactivo es sólido. Con esta primera dosis de antiespumante observamos un descenso en el nivel de espuma de hasta por debajo de 150cm³ que se mantiene constante hasta el minuto 300 (4 horas). Se procede a agregar 10g más del reactivo en el minuto 300 y observamos casi una eliminación completa de la espuma en el minuto 315.

4.2.3. Análisis de datos obtenidos con Polietilenglicol

Se realiza una cuarta experimentación con una concentración de 3g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en donde se emplea Polietilenglicol como antiespumante durante la reacción. El Polietilenglicol es un líquido incoloro y viscoso que no afecta las características organolépticas del sustrato como color u olor.

En la ilustración 19 se observa como el Polietilenglicol usado como antiespumante influye en el consumo de los grados Brix y en la producción de alcohol durante la fermentación.

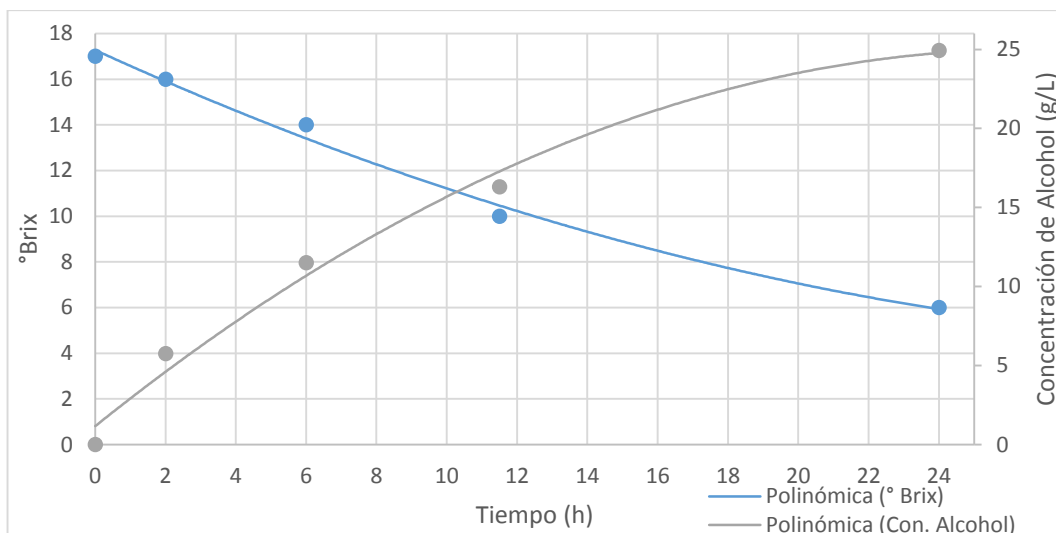


Ilustración 19. Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 3g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando Polietilenglicol como antiespumante

Elaborado por: Autora

Con el Polietilenglicol se obtiene una concentración máxima de alcohol de aproximadamente 25g/L a las 24 horas de fermentación, de manera que el uso de este antiespumante no influye directamente en la producción de alcohol. Los grados Brix descienden de manera normal hasta llegar a un valor de 6°. El Polietilenglicol no influye en las características físico – químicas del sustrato como son el pH o el DO y tampoco en las características organolépticas como color u olor.

En la ilustración 20 se observa la acción antiespumante del Polietilenglicol con la medida del volumen de la espuma en función del tiempo y la adición de dicho reactivo.

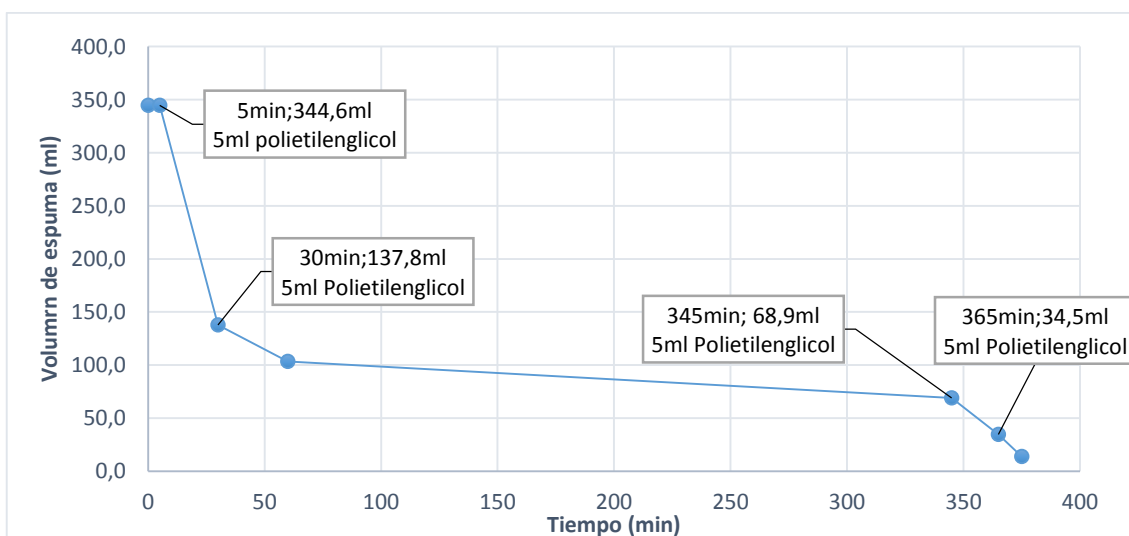


Ilustración 20. Efecto del Polietilenglicol en la disminución de espuma con una concentración de 3g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Elaborado por: Autora

En la hora crítica de la fermentación la espuma alcanza un nivel de aproximadamente 350 cm³ y se agrega los primeros 5ml de Polietilenglicol sin haber una variación importante en el nivel de espuma por lo que se decide agregar 5ml más de antiespumante 30 minutos después de la hora crítica disminuyendo el nivel de espuma hasta por debajo de 150cm³ llegando a 100cm³ en el minuto 60 (1 hora). A los 345 minutos de la formación crítica de espuma (aproximadamente a las 6 horas) se añaden 5ml más de Polietilenglicol mientras la espuma continúa descendiendo hasta por debajo de los 50 cm³; en el minuto 365 se colocan 5ml de antiespumante llegando al máximo de concentración con un nivel de espuma de aproximadamente 20cm³.

4.2.4. Acción inicial de los antiespumantes

Se Evalúa la acción de los antiespumantes durante la primera hora de uso para determinar cuál de ellos genera una rápida acción en la eliminación de espuma, para ello se analiza la gráfica obtenida en la ilustración 21 en donde se puede observar el volumen de espuma en función del tiempo para cada uno de los antiespumantes durante los primeros 60 minutos.

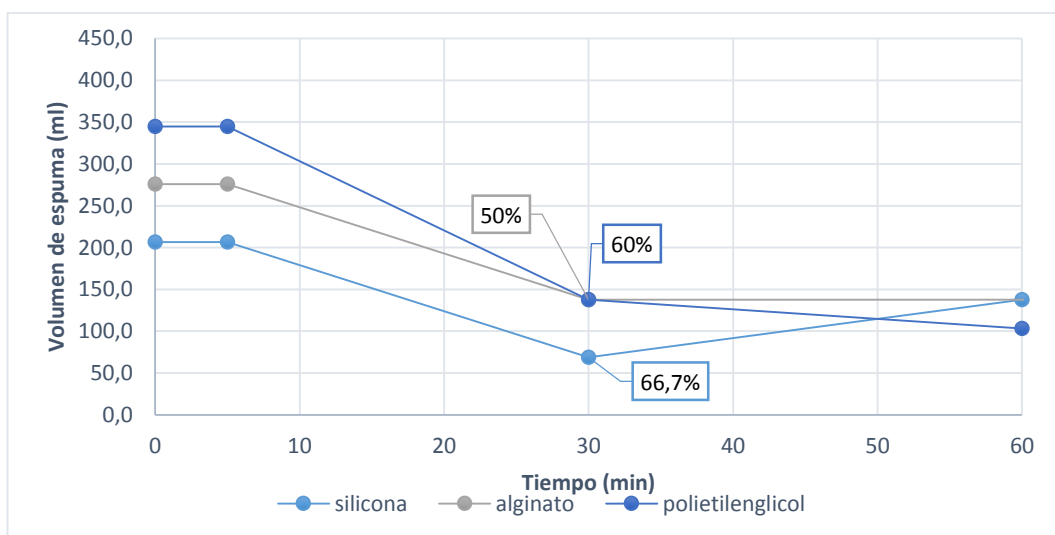


Ilustración 21. Efectividad de los antiespumantes durante la primera hora de acción.

Elaborado por: Autora

Se puede observar que el nivel de espuma inicial no es el mismo para los tres, no obstante, el descenso es similar en los tres casos. Con el aceite siliconado se da un descenso rápido en los primeros 30 minutos, logrando eliminar el 66,7% de la espuma;

continúa descendiendo, hasta que a los 60 minutos empieza a subir nuevamente; el Alginato de sodio genera un descenso mucho más lento y llega a un valor constante a los 30 minutos logrando eliminar el 50% de la espuma en este tiempo; con el Polietilenglicol se tiene un descenso rápido igual que la silicona logrando eliminar el 60% de la espuma en los 30 primeros minutos y continúa descendiendo constantemente.

4.2.5. Evaluación de la productividad

Se realizará una evaluación de la productividad de cada experimento en el mismo tiempo que serán 24 horas, para de esta manera tener una referencia de cómo cada antiespumante afecta o no la producción de bioetanol. Para determinar la productividad de cada experimento se aplicará la ecuación 7. En donde se toma el valor obtenido de la concentración de alcohol a las 24 horas de fermentación.

Ecuación 7. Fórmula para el cálculo de la productividad de la fermentación

$$Productividad = \frac{\text{Concentración de Bioetanol}}{\text{Tiempo}} = \left[\frac{g/L}{h} \right]$$

Adaptado de: (Serpa Nieves & Tenesaca Castillo, 2018)

*Tabla 8. Productividad del proceso fermentativo con concentración de 3g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* a las 24 horas de experimentación*

EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD				
Experimento	Antiespumante	Concentración de alcohol (g/L)	Tiempo (horas)	Productividad
0	-	24,699	24	1,029
1	Aceite siliconado	25,178	24	1,049
2	Alginato de Sodio	21,102	24	0,879
3	Polietilenglicol	24,938	24	1,039

Elaborado por: Autora

En la tabla 8 se observa que la productividad de la fermentación alcohólica con una concentración de 3g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* sin el uso de antiespumantes es de 1,03. Con el uso de aceite siliconado y de Polietilenglicol no se presenta gran variación de este valor dando un valor ligeramente superior de 1,05 y 1,04 respectivamente; sin embargo, con el uso de Alginato de sodio como antiespumante se puede observar que se da un descenso importante en la productividad de bioetanol a

0,88 lo que permite descartar este antiespumante ya que afecta directamente en el proceso fermentativo.

4.3. Análisis y resultados obtenidos en la experimentación con 10g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Se realizaron 3 experimentaciones con una concentración de 10g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae*; en cada una se evaluó la acción de un antiespumante diferente en función de la eliminación de espuma, consumo de grados Brix, concentración de alcohol obtenida, además de las características físico químicas como pH, oxígeno disuelto y ciertas características organolépticas que puedan verse afectadas.

4.3.1. Análisis de datos obtenidos con aceite siliconado

En la primera experimentación se lleva a cabo una fermentación con 10g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en donde se utiliza aceite siliconado como antiespumante. Como se dijo anteriormente, este reactivo no genera variaciones en el pH u oxígeno disuelto del medio, aunque si produce una variación en la coloración del sustrato.

En la ilustración 22 se presenta una gráfica en donde evaluaremos el consumo de grados Brix y la producción de etanol en función del tiempo.

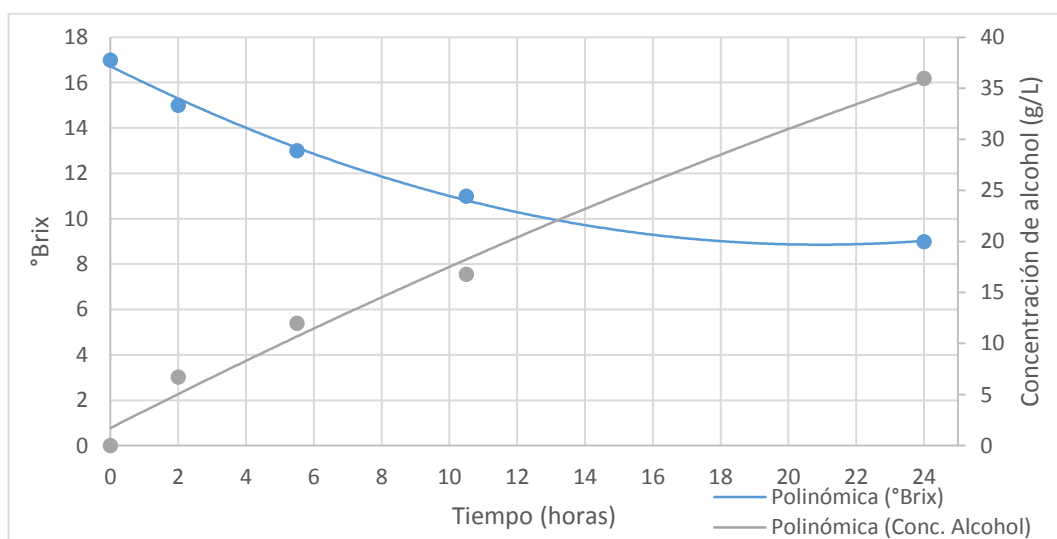


Ilustración 22. . Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 10g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando Aceite Siliconado como antiespumante.

Elaborado por: Autora

Al igual que en el caso del uso de aceite de silicona como antiespumante con una concentración de 3g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el consumo de grados Brix no desciende más allá de 9°, confirmando que el aceite siliconado inhibe el consumo de azúcares por las levaduras. La concentración de alcohol por otro lado llega a un punto máximo a las 24 horas de aproximadamente 36g/L.

En la ilustración 23 se puede ver la relación entre la disminución de espuma y la concentración de antiespumante en función del tiempo.

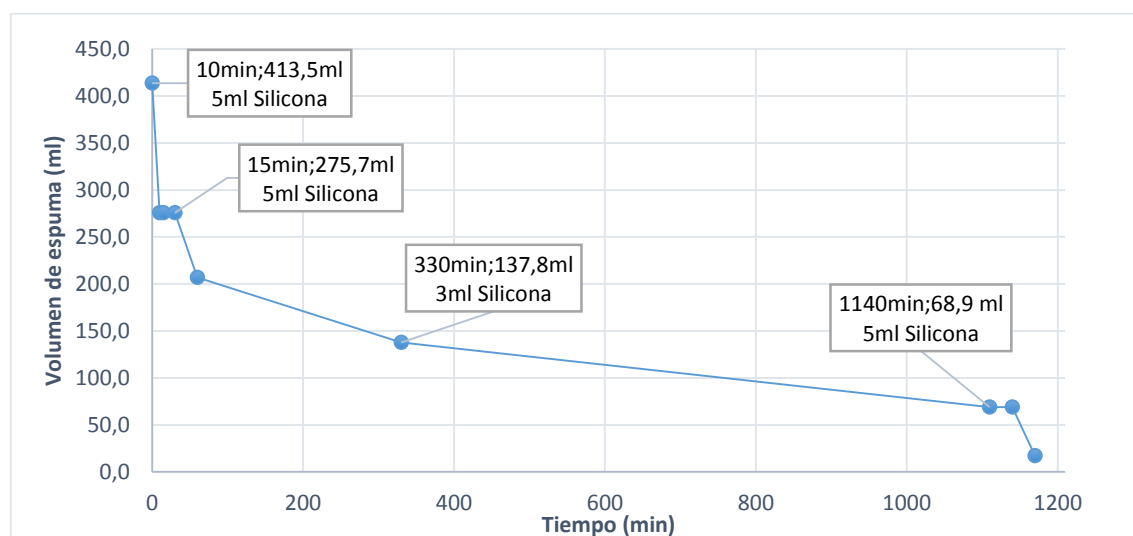


Ilustración 23. Efecto del Aceite Siliconado en la disminución de espuma con una concentración de 10g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Elaborado por: Autora

En la gráfica se observa que, en la hora crítica de formación de espuma, esta llega a un valor superior a 400cm³; la primera aplicación de 5ml de antiespumante en los primeros 10 minutos da un descenso de la espuma a aproximadamente un valor de 275cm³ que se mantiene constante por 30 minutos, a pesar de que se realiza una segunda aplicación de 5ml de aceite siliconado en el minuto 15. Después de los 30 primeros minutos la espuma empieza a descender gradualmente durante 5 horas, en este punto se aplica nuevamente 5ml de antiespumante permitiendo un descenso de la espuma a 60cm³ manteniéndose constante por 30 minutos hasta la aplicación de los últimos 5ml de aceite siliconado disminuyendo el nivel de espuma a un valor de aproximadamente 20cm³ llegando a la concentración máxima de antiespumante.

4.3.2. Análisis de datos obtenidos con Alginato de Sodio

La segunda experimentación en este grupo se lleva a cabo con una concentración de 10g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando Alginato de sodio como antiespumante. Este reactivo afecta directamente en el pH del sustrato aumentándolo en cada aplicación a 4,03; no obstante, no afecta las características físico químicas del sustrato como color u olor. Lo que si se ve afectado de manera directa es el manejo del equipo ya que su dilución no es completa y homogénea lo que hace más difícil la toma de muestras.

En la ilustración 24 se gráfica el comportamiento de la fermentación en el tiempo en función del consumo Brix y producción de bioetanol.

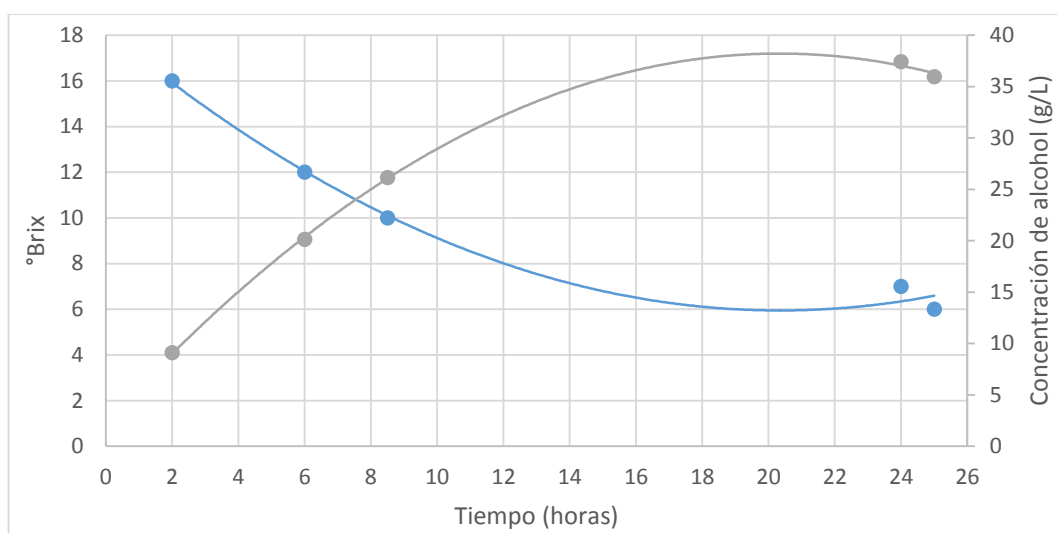


Ilustración 24. Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 10g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando Alginato de Sodio como antiespumante.

Elaborado por: Autora

En la gráfica se observa que el descenso de grados Brix se da de manera regular hasta llegar a un valor de 6°Bx en un tiempo de 25 horas, demostrando que se da una disminución en la velocidad de fermentación en el proceso. Con respecto a la producción de alcohol se da una máxima concentración a las 24 horas con un valor aproximado de 37g/L que aumentó de manera exponencial.

En la ilustración 25 se presenta una gráfica en donde se describe la acción del Alginato de sodio como antiespumante en función del tiempo.

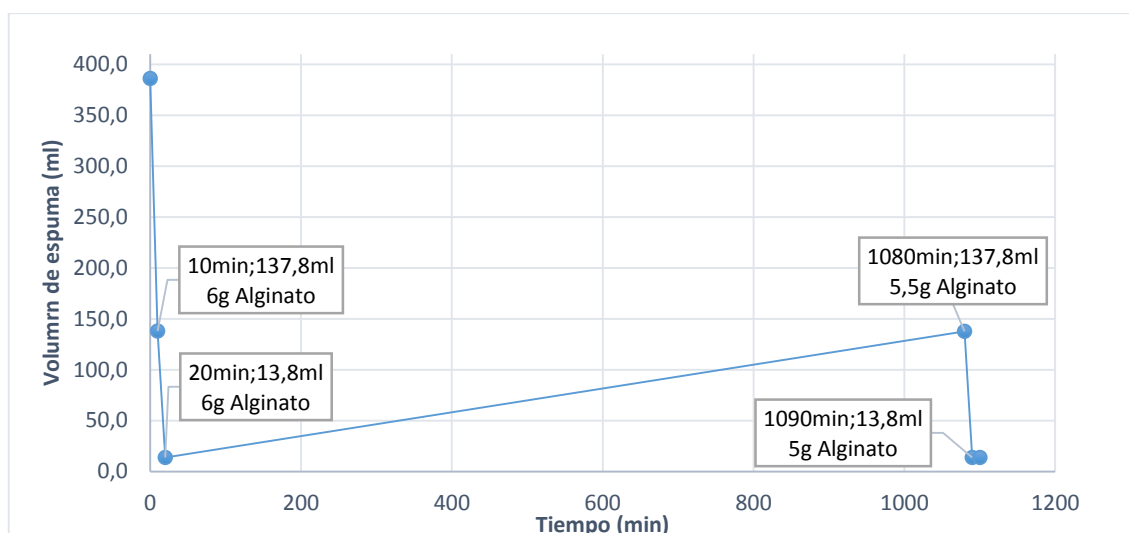


Ilustración 25. Efecto del Alginato de Sodio en la disminución de espuma con una concentración de 10g/L de *Levadura Saccharomyces cerevisiae*

Elaborado por: Autora

En la gráfica se puede observar que en la hora crítica de formación de espuma esta tiene un nivel de aproximadamente 400cm³. Se agregan 6g de Alginato de sodio como antiespumante y después de 10 minutos a descendido el nivel de espuma a aproximadamente 150cm³. Después en el minuto 20 se agregan nuevamente 6g de antiespumante logrando descender la espuma a un valor inferior a 20cm³. Transcurridas las horas la espuma vuelve a subir de nivel hasta alcanzar un valor superior a 150cm³ en el minuto 1080 (18 horas) por lo que se decide agregar 5,5g más de Alginato de sodio. Se agregan finalmente los últimos 5g de antiespumante llegando a la concentración máxima del mismo permaneciendo el nivel de espuma por debajo de los 20cm³.

4.3.3. Análisis de datos obtenidos con Polietilenglicol

La tercera y última experimentación realizada con una concentración de 10g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* se llevó a cabo para determinar la efectividad como antiespumante del Polietilenglicol. Este compuesto no interfirió en las características físico químicas del sustrato como pH y oxígeno disuelto, así como en las características organolépticas del mismo.

En la ilustración 26 se puede observar una gráfica en donde se encuentra el consumo de grados Brix en función del tiempo, así como la producción de alcohol en función del tiempo con el uso de este antiespumante.

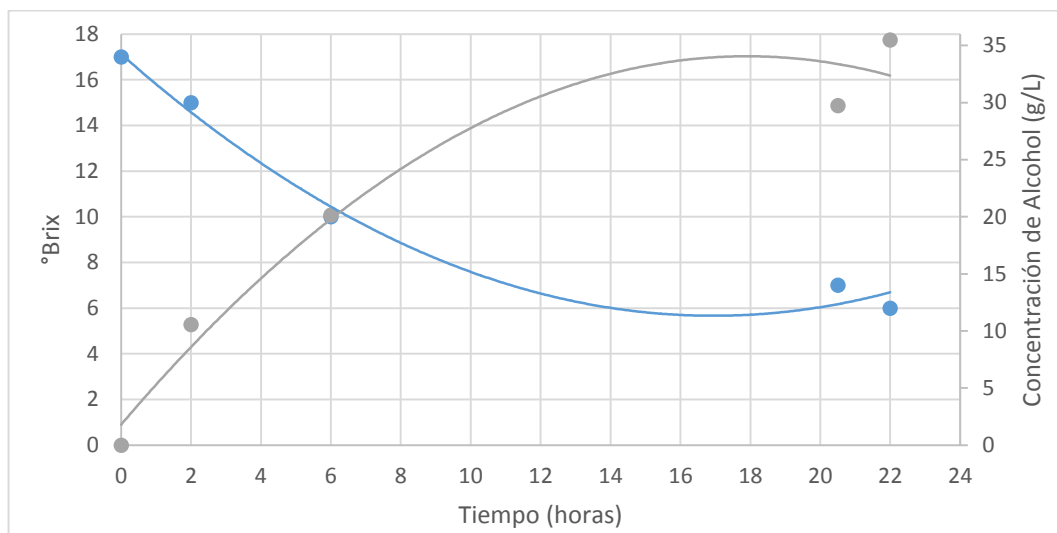


Ilustración 26. Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 10g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando Polietilenglicol como antiespumante.

Elaborado por: Autora

En la gráfica se observa como el consumo de grados Brix se da de manera regular llegando a un valor de 6° Brix a las 22 horas de fermentación, de tal manera que no se ve afectada la velocidad de fermentación e incluso se llega a mejorar. La máxima concentración de bioetanol obtenida en esta fermentación es de 35g/L aproximadamente; después de esto empieza la fase de latencia e inhibición de las levaduras.

En la ilustración 27 se muestra una gráfica en donde se determina la relación entre la disminución de espuma y la cantidad de antiespumante empleado en función del tiempo; de esta manera se analiza la efectividad del Polietilenglicol como antiespumante.

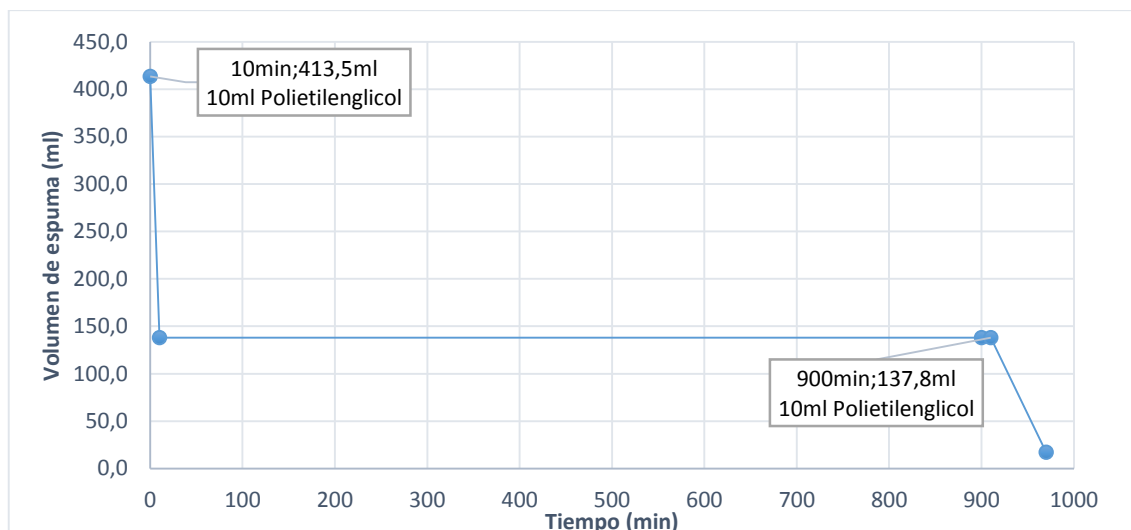


Ilustración 27. Efecto del Polietilenglicol en la disminución de espuma con una concentración de 10g/L de *Levadura Saccharomyces cerevisiae*

Elaborado por: Autora

En la hora crítica la espuma alcanza un nivel mayor a 400cm^3 , se agregan de esta manera los primeros 10ml de Polietilenglicol y en 10 minutos se logra descender el nivel de la espuma por debajo de 150cm^3 manteniéndose en este nivel durante 15 horas hasta el minuto 900. Se agrega en este punto nuevamente 10ml del antiespumante llegando a la concentración máxima de éste logrando disminuir en el transcurso de una hora el nivel de espuma por debajo de 20cm^3 .

4.3.4. Acción Inicial de los Antiespumantes

Para evaluar la efectividad de los antiespumantes se realiza una gráfica en donde se ve el descenso de espuma en la primera hora de aplicación de los antiespumantes, esta se encuentra en la ilustración 28. Esto permite decidir cuál de los 3 antiespumantes nos ofrece una rápida acción en menor tiempo.

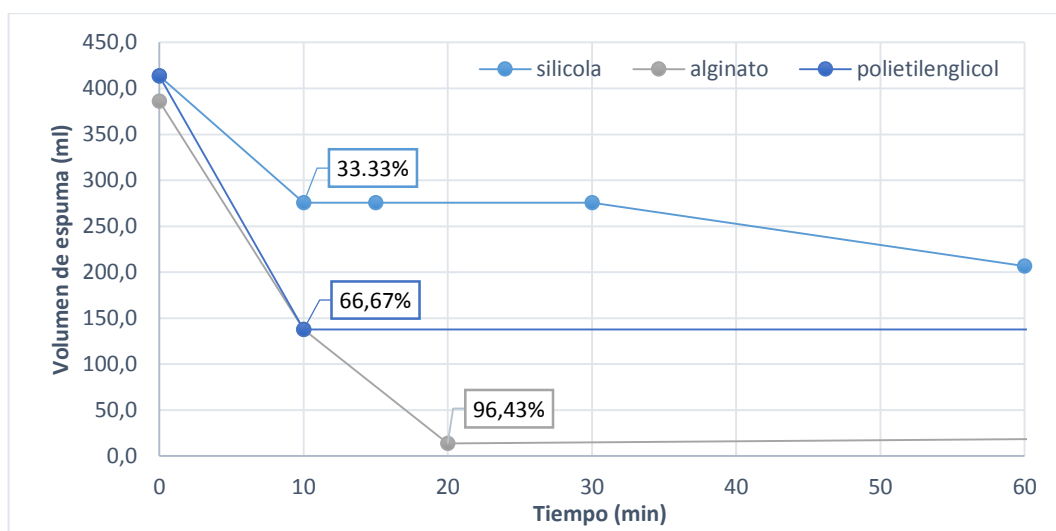


Ilustración 28. Efectividad de los antiespumantes durante la primera hora de acción

Elaborado por: Autora

En la gráfica se puede observar que la espuma empieza prácticamente del mismo nivel para los tres casos; con el aceite siliconado el descenso es menor que con los otros dos antiespumantes, también se observa que la velocidad de eliminación es lenta y apenas elimina el 33,33% de espuma después de una hora; en el caso del Polietilenglicol se da un descenso rápido de la espuma en los primeros 10 minutos con la primera aplicación permitiendo eliminar el 66.67% de la espuma que se mantiene durante casi toda la fermentación; por último, el alginato de sodio tarda 20 minutos y con su segunda aplicación se alcanza niveles mínimos de espuma que se mantienen por más de una hora, logrando eliminar el 96,43% de espuma.

4.3.5. Evaluación de la productividad

Se evalúa la productividad de cada antiespumante utilizando la ecuación 7 en donde se toma el valor de concentración de bioetanol más alto en el tiempo que se ha producido. Los resultados se pueden observar en la tabla 9.

Tabla 9. Productividad del proceso fermentativo con concentración de 10g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD				
Experimento	Antiespumante	Concentración de alcohol (g/L)	Tiempo (horas)	Productividad
5	Aceite Siliconado	35,969	24	1,499
6	Alginato de Sodio	37,408	24	1,559
7	Polietilenglicol	35,489	22	1,613

Elaborado por: Autora

Se observa que la productividad de cada fermentación aumenta en función de los resultados obtenidos en la tabla 8; ya que se está utilizando una mayor cantidad de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En este caso la mayor productividad se da con el Polietilenglicol dando un valor de 1.61 esto es principalmente por que se da una fermentación más rápida; seguido de la productividad obtenida con alginato de sodio llegando a un valor de 1.56, casi duplicando el valor obtenido con la fermentación de 3g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae*; por último, se obtiene un valor de 1,5 para la fermentación realizada con aceite siliconado siendo esta la menor productividad ya que se obtiene una menor concentración de alcohol en un mayor tiempo.

4.4. Selección del mejor antiespumante

Para realizar una experimentación con 20g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* se debe hacer una selección de cuál de los tres antiespumantes presenta los mejores beneficios para la fermentación. Para ello se toma en cuenta el análisis y resultados obtenidos anteriormente.

4.4.1. Beneficios y desventajas de trabajar con Aceite siliconado como antiespumante.

El primer antiespumante a analizar es el aceite siliconado, este al trabajar con las diferentes concentraciones de levadura *Saccharomyces cerevisiae* no presenta interferencias en características físico químicas como son pH y oxígeno disuelto. Sin embargo, este antiespumante interfiere en el consumo de grados Brix ya que en los dos casos se notó una inhibición en el consumo cuando se llega a 9° de manera que se puede decir que interfiere directamente con el proceso de fermentación. En la producción de alcohol este antiespumante no presenta mayor interferencia ya que los valores de productividad no resultan ser muy diferentes que con los otros antiespumantes o sin ellos. Por otro lado, este antiespumante presenta un cambio en el color del sustrato volviéndolo un poco más claro, lo que también genera una influencia para su selección.

Con respecto a la remoción de espuma, cuando se trabaja con una concentración de 3g/L de levadura se puede ver que esta disminuye y vuelve a aumentar paulatinamente para lo cual es necesario agregar una mayor cantidad de antiespumante; con una concentración de 10g/L de levadura se necesita llegar a por lo menos la tercera parte de la concentración de antiespumante para poder observar una eliminación completa de la espuma. En la primera hora de acción del aceite siliconado como antiespumante, en los dos casos, se observa un buen descenso en el tiempo sin embargo no es el mejor.

4.4.2. Beneficios y desventajas de trabajar con Alginato de sodio como antiespumante.

El segundo antiespumante a analizar es el alginato de sodio, como se sabe este es un conocido espesante; se puede notar que este presenta resultados muy variantes al trabajar con las dos concentraciones de levadura; cuando se trabajó con una concentración de 3g/L de levadura este antiespumante inhibía la producción de bioetanol obteniendo la productividad más baja, en cambio, cuando se trabajó con 10g/L de levadura se observó que el proceso de fermentación se daba de manera normal obteniendo un valor muy cercano de productividad al de los otros antiespumantes, e incluso se puede ver que la producción de bioetanol es mayor.

Este compuesto no altera de manera directa el consumo de Brix durante la reacción, pero se altera el pH del medio subiéndolo a 4,03 en cada aplicación con las dos concentraciones de levadura. Además de esto en cuestión de factibilidad de manejo de reactivo este presenta dificultades ya que al ser un polvo no presenta una dilución completa en el medio haciendo difícil su dosificación.

En la eliminación de espuma se puede ver que con una concentración de 3g/L de levadura la disminución del nivel de espuma se da de manera gradual según se va agregando mayor cantidad de antiespumante, mientras que con una concentración de 10g/L de levadura se da una disminución rápida del nivel de espuma.

En la primera hora de acción del antiespumante en el caso de la experimentación de 3g/L de levadura el descenso no es significativo y se mantiene constante por 30 minutos mientras que con el experimento de 10g/L presenta un descenso casi completo del nivel de espuma a los 20 minutos permaneciendo constante por más de una hora.

4.4.3. Beneficios y desventajas de trabajar con Polietilenglicol como antiespumante.

El Polietilenglicol es el que menos desventajas presenta, ya que se tiene mucha. Tanto con una concentración de levadura de 3g/L como con 10g/L este antiespumante no interfiere en características físico químicas como pH, oxígeno disuelto, consumo de grados Brix o concentración de alcohol. Tampoco interfiere de manera directa en las características organolépticas del sustrato como color ni olor, demostrando que este compuesto no afecta la fermentación. Evaluando la productividad de la fermentación que se obtuvo con el Polietilenglicol con una concentración de 3g/L de levadura no se tiene una gran variación con los resultados normales y con una concentración de 10g/L de levadura se observa que se obtiene la mayor productividad y la reacción se da en menor tiempo.

En la evaluación de la acción inicial de los antiespumantes durante la primera hora de formación de la espuma cuando se trabaja con una concentración de 3g/L de levadura el Polietilenglicol posee una pendiente mucho más pronunciada lo que significa un mayor descenso en el nivel de la espuma en los primeros 10 minutos y mantiene un valor constante desde ese punto por más de una hora; estos resultados son los mismos que se observan con la experimentación de 10g/L de levadura dándole constancia a las experimentaciones.

Se determina entonces que, trabajar con Polietilenglicol implica menos cambios y variaciones en los resultados de la fermentación alcohólica anaerobia; además que este compuesto es la base de los antiespumantes utilizados en proteína recombinante, por esta razón se decide que es la mejor opción en la fermentación alcohólica anaerobia.

4.5. Análisis y resultados obtenidos en la experimentación con 20g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Se realiza una experimentación con una concentración de 20g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en donde se utiliza Polietilenglicol como antiespumante. Los valores obtenidos de consumo de grados Brix y producción de bioetanol se ven a continuación en la ilustración 28.

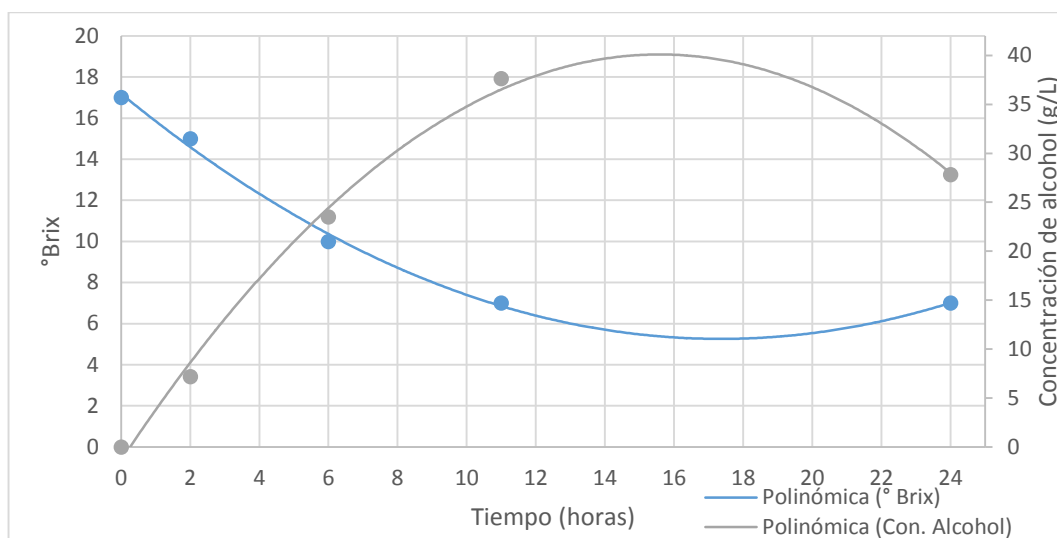


Ilustración 29. Consumo de °Brix y Producción de Alcohol en función del tiempo con una concentración de 20g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando Polietilenglicol como antiespumante.

Elaborado por: Autora

En la gráfica se observa que el consumo de grados Brix se realiza con normalidad, sin embargo, este valor no desciende a más de 7°brix. En lo que se refiere a producción de bioetanol este alcanza su mayor concentración a las 16 horas aproximadamente con un valor de 40g/L.

Con estos valores se puede calcular la productividad de la fermentación en donde se utiliza la ecuación 7, dividiendo el valor más alto de concentración de bioetanol para el tiempo en horas que le tomo llegar a dicha concentración.

$$Productividad = \frac{\text{Máxima concentración de bioetanol}}{\text{Tiempo de máxima concentración de bioetanol}} = \frac{37,65 \text{ g/L}}{11 \text{ h}} = 3,42$$

Se observa como la productividad de la fermentación aumenta según aumenta la concentración de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, permitiendo obtener la misma concentración de alcohol en menos tiempo.

La efectividad para la remoción de espuma también se analizó para lo cual se evalúa la ilustración 30 en donde se observa el comportamiento de la espuma en función del tiempo y la cantidad de antiespumante utilizado.

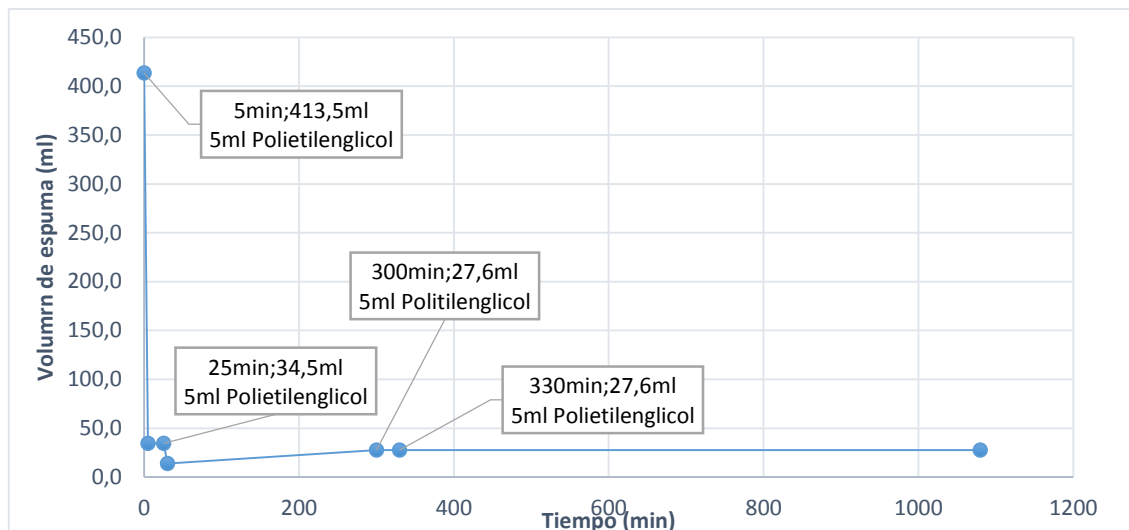


Ilustración 30. Efecto del Aceite Siliconado en la disminución de espuma con una concentración de 20g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Elaborado por: Autora

El descenso de la espuma en este caso se da de manera inmediata desde un valor superior a 400cm³ en la hora crítica de fermentación hasta un valor inferior a 50cm³ después de 5 minutos que se mantiene constante con el uso de 5ml de antiespumante. A los 25 minutos se decide agregar 5ml más de Polietilenglicol logrando disminuir a un nivel inferior a 20cm³ de espuma, sin embargo, este vuelve a subir y se mantiene constante en un valor de aproximadamente 28cm³ hasta el final de la fermentación, a pesar de que se agregó el antiespumante en dos ocasiones mas, en el minuto 300 y 330;

CAPITULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los diferentes antiespumantes utilizados en la fermentación alcohólica anaerobia a partir de mucilago de cacao CCN-51 permitieron mejorar el proceso ya que con cada uno de estos se logró disminuir la espuma formada, cumpliendo con la función de ser un efectivo desespumante, que es como se planteó el método de prueba de la efectividad de los mismos, no obstante, no trabajan de la misma manera ya que se ven influenciados por el medio; tomando en cuenta que las condiciones de trabajo cambiaron con el cambio de concentración de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Cuando se trabajó con una concentración de levadura de 3g/L se observa menor cantidad de espuma alcanzando niveles entre 200 y 350 cm³ sin tener un valor constante en ninguna de las experimentaciones y la eliminación de la misma se da de manera lenta y en función de la concentración de antiespumante utilizada; en cambio, cuando se trabajó con una concentración de 10g/L de levadura en todas las experimentaciones el volumen de espuma estuvo alrededor de 400cm³ y la eliminación de la espuma se realizó de manera efectiva con bajas concentraciones de antiespumante y en tiempos cortos; y finalmente cuando se trabajó con 20 g/L de levadura la espuma también alcanzo un nivel máximo de 400cm³ no obstante, la formación de espuma empezó dos horas antes que en los casos anteriores. De esta manera se puede demostrar que la concentración de levadura *Saccharomyces cerevisiae* está directamente relacionada con la formación de espuma, aunque esta relación no es precisamente proporcional.

Cada uno de los tres antiespumantes utilizados generaron diversos efectos en la fermentación alcohólica anaerobia de mucilago de cacao CCN-51; el aceite siliconado cambia el color del sustrato e inhibe el consumo de los grados Brix interfiriendo de manera directa en las propiedades físico químicas del proceso, también se debe tomar en cuenta que la concentración máxima de esta en alimentos es de 0,001% y en este caso se llegó a utilizar hasta en una concentración de 1% por lo que esta debe ser la principal razón por la que interviene en la correcta fermentación del mucilago de cacao;

el alginato de sodio cambia el pH del sustrato en cada aplicación, además presenta resultados dependiendo de la concentración de levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de bioetanol y en la efectividad de eliminación de espuma; por último, el Polietilenglicol no se encontró que interfiriera directamente en ninguna propiedad físico química ni característica organoléptica, dando los mejores resultados para trabajar con este antiespumante por su inocuidad ya que presenta resultados proporcionales a pesar de la variación de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, por esta razón este antiespumante fue seleccionado para trabajar con una tercera concentración de levadura de 20g/L.

El Polietilenglicol muestra una efectividad en la eliminación de espuma con una concentración del 0,25%; gracias al uso de este antiespumante se pudo trabajar con una concentración de 20g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación anaerobia de Mucilago de cacao CCN-51, obteniendo valores cercanos a 40g/L de bioetanol en un periodo de tiempo de 16 horas aproximadamente. Al trabajar con esta cantidad de levadura se logra llegar a una productividad de 3.4, de manera que esta es aumentada en más del 100% mostrando una mejora significativa del mismo por el uso de antiespumantes. Sin embargo, pasadas las 16 horas empieza la inhibición de la producción de alcohol en el medio y la concentración del mismo empieza a descender, la inhibición se puede producir por diversos procesos oxidativos que interfieren en la producción de etanol, como por ejemplo la producción de ácido acético en anaerobiosis por la acción de las levaduras con el ácido pirúvico, y el descenso de la cantidad de etanol en el producto final podría deberse a la formación de productos secundarios que se dan a partir del etanol, como por ejemplo la formación de esteres volátiles que se dan por la reacción entre un ácido y un alcohol.

RECOMENDACIONES

Para un manejo del biorreactor tipo Batch “Biotron GX Single Vessel” más sencillo es mejor trabajar con soluciones diluidas de los diferentes reactivos sólidos que se van empleando.

Realizar un estudio con formulaciones de antiespumantes que se encuentren en el mercado como sustancias complejas, para determinar si presentan o no mejores características para la eliminación de espuma como es el tiempo de acción en menores concentración.

Cuando se trabaje con reactivos solidos como el alginato de sodio en este caso, es mejor licuar este reactivo con una pequeña cantidad de sustrato para tener una consistencia más homogénea.

BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Abdolahi, F., Moosavian, M. A., & Vatani, A. (29 de Noviembre de 2005). *The Mechanism of Action of Antifoams*. Obtenido de Jornal of Applied Sciences : <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/jas/2005/1122-1129.pdf>
- Abril Alvarez, C. (2014). *Determinación de etanol con fines medicos y medico legales*. Cuenca: Universidad Catolica de Cuenca.
- AGRO WASTE. (15 de Febrero de 2013). *Fermentación Alcohólica - Bioetanol*. Obtenido de Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y alimentación: <http://www.agrowaste.eu/wp-content/uploads/2013/02/FERMENTACION-ALCOHOLICA.pdf>
- Alvarado, A., & Valdez , M. (26 de Febrero de 2018). *Determinación de los parámetros cinéticos como: la velocidad máxima de reacción y la constante de crecimiento en el proceso fermentativo del mucílago de cacao CCN-51 caso Ecuador, Zona 6*. Cuenca: Universidad de Cuenca. Obtenido de Universidad de Cuenca .
- Anecacao. (14 de Enero de 2015). *Cacao Nacional*. Obtenido de Asociación Nacional de Exportadores de Cacao - Ecuador: <http://www.anecacao.com/index.php/es/quienes-somos/cacao-nacional.html>
- Antolinez, D., Bohorquez, J., & Corredor, A. (11 de Noviembre de 2015). *Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta* . Obtenido de SCielo: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v13n24/v13n24a06.pdf>
- Astudillo , G., & Pacheco, M. (25 de Agosto de 2017). La Ecopaís está disponible en el 40% de las estaciones. Cuenca, Azuay, Ecuador.
- Avendaño Romero , G. C., Lopez Malo , A., & Palou, E. (2013). *Propiedades del Alginate y Aplicaciones en Alimentos*. Puebla: Universidad de las Américas.
- Bailón Neira , R. (30 de Abril de 2012). *Fermentaciones Industriales*. Obtenido de Universidad Nacional del Callao: https://unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/IF_MAYO_2012/IF_BAILON%20NEYRA_FIPA.pdf
- Codex Alimentarius. (14 de Junio de 2018). *Codex Alimentarius 192, Normas Internacionales de los alimentos*. Obtenido de NORMA GENERAL PARA LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS: http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192s.pdf

- Cortés Gómez, A. (10 de Noviembre de 2015). *Evaluación Fisicoquímica de nuevos Poliéteres como agenstes antiespumantes en aceites crudos Mexicanos*. Obtenido de Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/17923/25-1-16806.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cuamatzi Tapia, O., & Melo Ruiz , V. (2006). Carbohidratos: Estructura y Función Biológica . En O. Cuamatzi Tapia, & V. Melo Ruiz, *Bioquímica de los Procesos Metabólicos* (págs. 41-66). Mexico D.F: : Reverte S.A.
- Díaz,, L., Pinoargote , M., & Castillo, P. (13 de Octubre de 2011). *Análisis de las Características Organolépticas del Chocolate a partir de Cacao CCN51 Tratado Enzimáticamente y Tostado a Diferentes Temperaturas*. Obtenido de Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL): <https://core.ac.uk/download/pdf/12414316.pdf>
- Fernandez N, J. (1950). El método de microdifusión de Conway. Su aplicación en el dosaje de amoniaco úrea y nitrógeno no proteico. En M. a. error, *Edward J Conway* (págs. 1318-1322). New York: Chemical Publishing Co Inc.
- García Garrido, S. (2009-2015). En *Centrales termoeléctricas de Biomasa* (págs. 1-54). Madrid: Renovetec. Recuperado el 14 de Marzo de 2019
- Gochev, G., Ulaganathan, V., & Miller, R. (18 de Febrero de 2016). *Foams*. Obtenido de Ullmann´s Encyclopedia of Industrial Chemistry : https://doi.org/10.1002/14356007.a11_465.pub2
- Guncay, J., & Silva , M. (2018). *Optimización de la producción de biomasa en procesos fermentativos del mucílago de cacao CCN– 51 aplicando la ecuación logística integrada y el modelo de Andrew y Levenspiel, bajo diferentes condiciones de operación*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Handrick, R., Ebert, S., Hesse, F., & Paul, A. (2017). *Identification of process conditions influencing protein aggregation in Chinese hamster ovary cell culture*. Biberach: Institute of Applied Biotechnology, Biberach University of Applied Sciences.
- Hernández Mora, J. A. (20 de Agosto de 2015). *Producción de etanol a partir de glicerina por vía fermentativa con Saccharomyces cerevisiae y simulación del Proceso a Escala Industrial* . Obtenido de Universidad de Manizales:

http://ridum.umanizales.edu.co:8080/xmlui/bitstream/handle/6789/2225/Hernandez_Mora_Jorge_Augusto_2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Hernández Rueda, P., Mafla Yépez, C., Benavides Cevallos, I., & Ramirez Paredes, F. (25 de Julio de 2018). *Análisis de factibilidad técnica para la producción de bioetanol a partir de residuos de maíz en Ecuador*. Recuperado el 7 de Marzo de 2019, de INNOVA: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6778596.pdf>

Höfer, R., Jost, F., Schwuger, M. J., Scharf, R., Geke, J., Kresse, J., . . . Erwied, W. (15 de Octubre de 2012). *Foams and Foam Control*. Obtenido de Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: https://doi.org/10.1002/14356007.a11_465#

Loango Chamorro, N. (2015). *Utilización de glicerol proveniente de la industria de biodiesel como fuente de carbono para la producción de lipasas recombinantes en Pichia Pastoris*. Bellaterra: Universidad Autónoma de Barcelona.

Marín Quemada, J. M., & San Martín González, E. (23 de Julio de 2013). *El futuro de los combustibles fósiles*. Recuperado el 26 de Febrero de 2019, de Universidad Nacional de Educación a Distancia – UNED: <https://canal.uned.es/uploads/materials/resources/pdf/4/1/1319025174814.pdf>

Nieto Galarza, H. (13 de Diciembre de 2009). *Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando Saccharomyces cerevisiae y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol*. . Obtenido de Escuela Politécnica del Ejército : <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/990/1/T-ESPE-026782.pdf>

Ñuez García, M., & García Triñanes, P. (13 de Septiembre de 2011). *BIOCOMBUSTIBLES: Bioetanol y Biodiesel*. Recuperado el 6 de Marzo de 2019, de Universidad de Santiago de Compostela: http://www.enciga.org/files/boletins/61/biocombustibles_bioetanol_y_biodiesel.pdf

Orellana, J. C. (2018). *Modelado de la ecuación de Gompertz modificado para la producción de bioetanol en procesos fermentativos dentro de un reactor tipo batch a partir de mucílago de cacao CCN-51. Caso: Ecuador - Zona 6*. CUENCA: Universidad de Cuenca.

Quarari. (05 de Octubre de 2017). Tipos de Cacao. Cuauhtémoc, Distrito Federal, México.

- Quizhpi Nieves, E. X. (2016). *Caracterización del mucílago de cacao CCN 51 mediante espectrofotometría UV-visible y absorción atómica” caso: Ecuador-zona 6*.
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/25266> : Universidad de Cuenca.
- Raymundo, A. I., Ramos Ramírez, E. G., Cruz Orea, A., & Salazar Montoya, J. A. (s.f.). *Efecto de la concentración de alginato de sodio en la obtención de hidrogeles*.
Obtenido de Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería :
<https://smbb.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/III/cartel es/CIII-43.pdf>
- Reyes Campoverde, N. E. (2017). *Diseño óptimo de plantas de fermentación discontinua* . Valparaíso: Universidad Técnica Federico Santa María .
- Routledge , S. J. (12 de Diciembre de 2012). *Beyond de-foaming: the effects of antifoams on bioprocess productivity*. Obtenido de Computational and structural biotechnology Journal: 10.5936 / csbj.201210014
- Serpa Nieves, A., & Tenesaca Castillo, O. (16 de Julio de 2018). *INFLUENCIA EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y ÁCIDO ACÉTICO CON EL INCREMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA LEVADURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN FERMENTACIONES ANAEROBIAS DELMUCÍLAGO DEL CACAO CCN-51*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
Recuperado el 28 de Febrero de 2019, de Universidad de Cuenca.
- Suaréz Machin, C., Garrido Carralero, N. A., & Guevara Rodríguez, C. A. (01 de Abril de 2016). *Saccharomyces cerevisiae. Características generales*. Obtenido de Levadura Saccharomyces cerevisiae y la producción de alcohol :
<http://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420004.pdf>
- Tarek Kakhia. (15 de Octubre de 2009). *What is the Defoamer*. Obtenido de Antifoaming Agents:
http://tarek.kakhia.org/books_eng/Defoamer.Tarek_Kakhia.pdf
- Urbina Vino . (26 de Noviembre de 2014). *Formación de Productos secundarios en la fermentación alcohólica del vino* . Obtenido de Urbina Vinos Blog:
<http://urbinavinos.blogspot.com/2014/11/formacion-de-productos-secundarios-en.html>

Uribe Gutierrez, L. (08 de Julio de 2007). *Características Fisiológicas*. Obtenido de Caracterización Fisiológica de Levaduras Aisladas de la Filósfera de Mora: <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis276.pdf>

Villagómez García , S. (2013). *OPTIMIZACIÓN Y APROVECHAMIENTO DEL RESIDUO (EXUDADO DEL MUCÍLAGO) DE LA ALMENDRA FRESCA DEL CACAO (Theobroma cacao L.) CCN51 EN LA ELABORACIÓN DE VINAGRE*. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial.

Vital López, P., & Larralde Corona , C. (10 de Noviembre de 2015). *Respuestas metabólicas al estrés de levaduras de importancia industrial*. Obtenido de Universidad Autónoma de Aguascalientes: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/674/67446178012/html/index.html>

ANEXOS

ANEXO I. Preparación de Reactivos para el método de Microdifusión de Conway

A. Dicromato de potasio (0,4N) en Ácido Sulfúrico (10N)

Peso molecular: $K_2Cr_2O_7 = 294 \text{ g/mol}$

Peso equivalente: $\text{Peso molecular} / 6 = 294 \text{ g/mol} / 6 = 49 \text{ g}$

1N	49g	1000ml	
1N	4,900g	100ml	
0,4N	x	100ml	$x = 1,960 \text{ g}$

Pesar 1,960 g de dicromato de potasio y disolver con una solución de ácido sulfúrico

10N en un balón de aforo de 100ml.

• Ácido Sulfúrico 10N

Peso molecular: $H_2SO_4 = 98 \text{ g/mol}$

peso equivalente: $\text{Peso molecular} / 2 = 98 \text{ g/mol} / 2 = 49 \text{ g}$

1N	49g	1000ml	
10N	x	100ml	$x = 49 \text{ g}$

Densidad= 1,840 g/ml Pureza= 98% $m = 49 \text{ g} \cdot 98\%$ $m = 48,020 \text{ g}$

$$\rho = \frac{m}{V} \quad V = \frac{m}{\rho} \quad V = \frac{48,020 \text{ g}}{1,840 \text{ g/l}} \quad V = 26,098 \text{ ml}$$

Medir 26,098ml en una probeta de 10ml e ir colocando poco a poco en un vaso de precipitación con 30ml de agua destilada, teniendo en cuenta que esta es una reacción exotérmica, por lo que se debe esperar hasta que la solución vuelva a temperatura ambiente. Una vez se enfrié la solución se debe aforar en un balón de aforo de 100ml.

B. Tiosulfato de sodio (0,1N)

Peso molecular: $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O = 248 \text{ g/mol}$

Peso equivalente = Peso molecular

1N	248g	1000ml	
0,1N	24,800g	1000ml	
0,1N	x	250ml	$x = 6,200 \text{ g}$

Pesar 6,200 g de tiosulfato de sodio pentahidratado y disolver con agua destilada en un balón de aforo de 250ml de capacidad.

C. Carbonato de Potasio (20%)

Al ser una solución al 20% p/v se deben pesar 20 g de carbonato de potasio y diluirlo con agua destilada en un balón de aforo de 100ml.

D. Yoduro de Potasio (3N)

Peso molecular: $KI = 166 \text{ g/mol}$

Peso equivalente: Peso molecular

1N	166g	1000ml	
3N	498g	1000ml	
3N	x	100ml	x= 49,800g

Pesar 49,800g de yoduro de potasio y disolver con agua destilada en un balón de aforo de 100ml de capacidad.

E. Almidón

Pesar 1 gramo de almidón soluble y diluir con aproximadamente 10ml de agua destilada y fría; verter esta dilución lentamente en 200ml de agua destilada en ebullición hasta que se obtenga un líquido claro y poco denso. Dejamos enfriar y tomamos solo el líquido sobrenadante. Tener en cuenta que esta solución debe estar siempre recién preparada. Se puede almacenar en un frasco limpio de plástico.

ANEXO II. Datos obtenidos en la experimentación con 3g/L de levadura

Saccharomyces cerevisiae

Tabla 10. Resultados Obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica sin el uso de antiespumante

1° Experimentación						
Sin Antiespumante						
Muestra		Tiempo (Horas)	° Brix	Titulación (ml)	Promedio (ml)	C. Alcohol (g/l)
0	1	0	17	7,700	7,783	0
	2			7,850		
	3			7,800		
1	1	6	14	7,450	7,467	9,112
	2			7,500		
	3			7,450		
2	1	12	12	7,150	7,150	18,224
	2			7,100		
	3			7,200		
3	1	18	9	6,900	6,867	26,377
	2			6,850		
	3			6,850		
4	1	24	6	6,900	6,917	24,938
	2			6,900		
	3			6,950		
Productividad						1,039

Tabla 11. Resultados obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica con aceite siliconado como antiespumante

2º Experimentación						
Antiespumante:			Aceite Siliconado	Volumen de mucilago:		2L
Muestra	Tiempo (horas)	º Brix	Antiespum (ml)	Titulación (ml)	Promedio (ml)	C. Alcohol (g/l)
0	1	0	17	-	3,700	0
	2			3,850		
	3			3,800		
1	1	2	15	-	3,750	0,959
	2			3,700		
	3			3,700		
2	1	6	13	5	2,850	13,668
	2				2,800	
	3				2,850	
3	1	10	11	5	2,650	16,546
	2				2,650	
	3				2,600	
4	1	24	10	5	2,000	25,178
	2				2,100	
	3				2,000	
5	1	26	9	5	2,400	21,821
	2				2,300	
	3				2,100	
Productividad						1,049

Tabla 12. Resultados obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica con alginato de sodio como antiespumante

3° Experimentación						
Antiespumante:		Alginato de sodio	Volumen de mucilago:		2L	
Muestra	Tiempo (horas)	° Brix	Antiespum (g)	Titulación (ml)	Promedio (ml)	C. Alcohol (g/l)
0	1	0	17	-	3,850	0
	2				3,700	
	3				3,800	
1	1	2	16	-	3,500	3,117
	2				3,550	
	3				3,650	
2	1	6	13	10	3,150	9,832
	2				3,100	
	3				3,050	
3	1	11	10	10	2,600	15,107
	2				2,850	
	3				2,750	
4	1	24	6	-	2,350	21,102
	2				2,400	
	3				2,200	
Productividad						0,879

Tabla 13. Resultados Obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica con Polietilenglicol como antiespumante

4° Experimentación							
Antiespumante				Polietilenglicol	Volumen de mucilago:		2L
Muestra	Tiempo (horas)	° Brix	Antiespum (ml)	Titulación (ml)	Promedio (ml)	C. Alcohol (g/l)	
0	1	0	17	-	1,900	1,917	0
	2				1,950		
	3				1,900		
1	1	2	16	-	1,800	1,817	5,755
	2				1,850		
	3				1,800		
2	1	6	14	10	1,700	1,717	11,510
	2				1,750		
	3				1,700		
3	1	12	10	5	1,650	1,633	16,306
	2				1,650		
	3				1,600		
4	1	24	6	5	1,450	1,483	24,938
	2				1,500		
	3				1,500		
Productividad							1,039

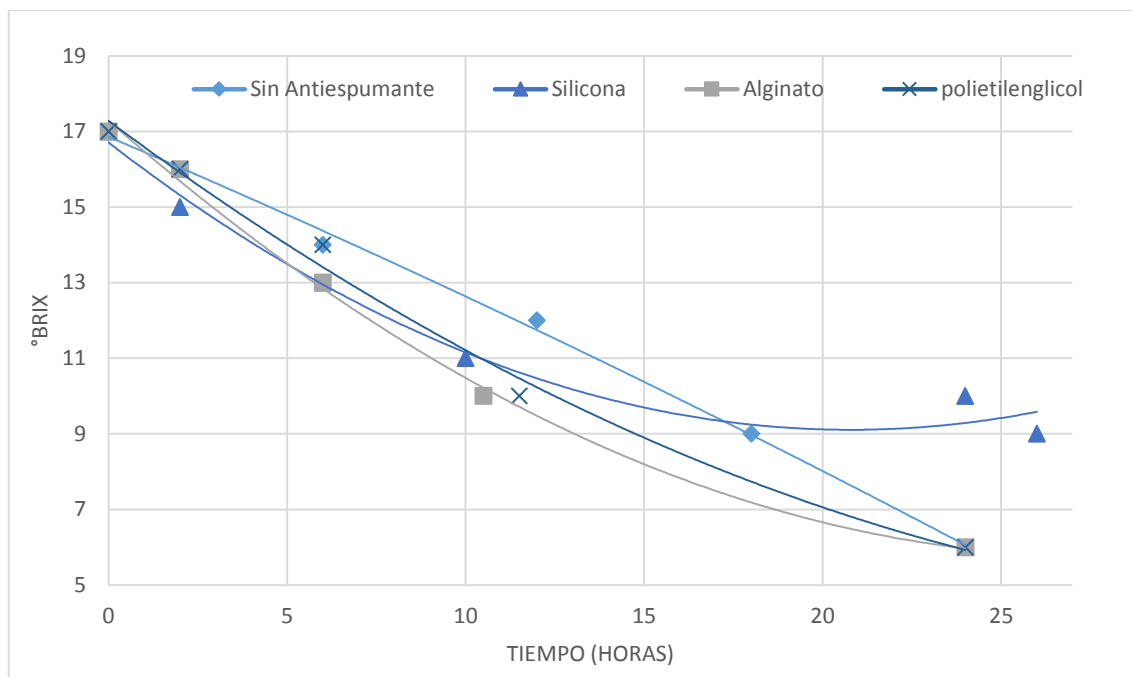


Ilustración 31. Resultados obtenidos en la fermentación alcohólica, consumo de grados Brix en función del tiempo, comparación en las cuatro experimentaciones

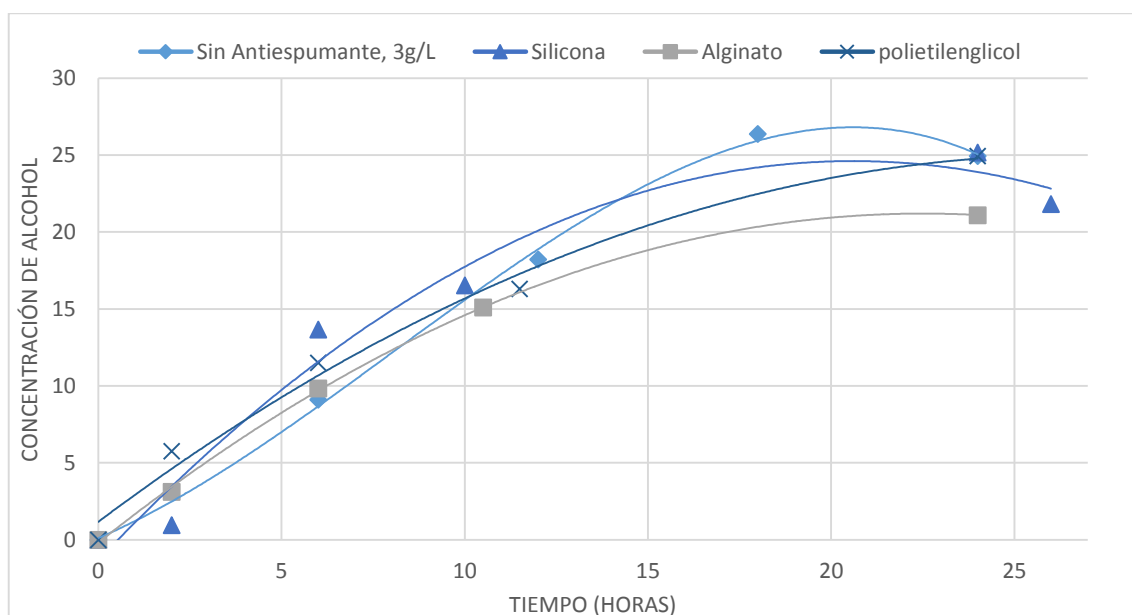


Ilustración 32. Resultados obtenidos en la fermentación alcohólica, producción de etanol en función del tiempo, comparación de los cuatro experimentos

Tabla 14. Resultados obtenidos para la eliminación de espuma en la fermentación alcohólica con el uso de aceite siliconado como antiespumante

Experimento 2		
Antiespumante:		Aceite Siliconado
tiempo (min)	Espuma (ml)	Antiespumante (ml)
0	206,756	0
5	206,756	5
30	68,900	5
60	137,800	5
240	137,800	10
245	13,784	10
1080	68,919	15
1150	68,900	20
1160	13,800	20

Tabla 15. Resultados obtenidos para la eliminación de espuma en la fermentación alcohólica con el uso de alginato de sodio como antiespumante

Experimento 3		
Antiespumante		Alginato de Sodio
tiempo (min)	Espuma (ml)	antiespumante (g)
0	275,675	0
5	275,675	10
30	137,837	10
300	137,837	20
315	13,800	20
1200	12,405	20

Tabla 16 Resultados obtenidos para la eliminación de espuma en la fermentación alcohólica con el uso de Polietilenglicol como antiespumante

Experimento 4		
Antiespumante:		Polietilenglicol
tiempo (min)	Espuma (ml)	antiespumante (ml)
0	344,593	0
5	344,593	5
30	137,837	10
60	103,378	10
345	68,919	15
365	34,459	20
375	13,784	20

ANEXO III. Datos obtenidos en la experimentación con 10g/L de levadura

Saccharomyces cerevisiae

Tabla 17. Resultados obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica con aceite siliconado como antiespumante

1° Experimentación							
		Antiespumante:		Aceite Siliconado	Volumen de mucilago:		1,8L
Muestra		Tiempo (horas)	° Brix	Antiespum (ml)	Titulación (ml)	Promedio (ml)	C. Alcohol (g/l)
0	1	0	17	-	3,850	3,783	0
	2				3,700		
	3				3,800		
1	1	2	15	-	3,550	3,550	6,714
	2				3,500		
	3				3,600		
2	1	5,5	13	10	3,350	3,367	11,990
	2				3,350		
	3				3,400		
3	1	10,5	11	3	3,200	3,200	16,785
	2				3,150		
	3				3,250		
4	1	24	9	5	2,800	2,533	35,969
	2				2,400		
	3				2,400		
Productividad							1,499

Tabla 18. Resultados obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica con alginato de sodio como antiespumante.

3° Experimentación							
		Antiespumante:		Alginato de sodio	Volumen de mucilago:		2L
Muestra		Tiempo (horas)	° Brix	Antiespum (g)	Titulación (ml)	Promedio (ml)	C. Alcohol (g/l)
0	1	0	17	-	3,150	3,217	0
	2				3,400		
	3				3,100		
1	1	2	16	6	2,550	2,583	9,112
	2				2,700		
	3				2,500		
2	1	6	12	6	1,850	1,817	20,143
	2				1,800		
	3				1,800		
3	1	8,5	10	5,5	1,450	1,400	26,137
	2				1,400		
	3				1,350		
4	1	24	7	5	0,550	0,617	37,408
	2				0,600		
	3				0,700		
5	1	25	6	-	0,750	0,717	35,969
	2				0,700		
	3				0,700		
Productividad							1,559

Tabla 19. Resultados obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica con Polietilenglicol como antiespumante

6° Experimentación							
		Antiespumante:		Polietilenglicol	Volumen de mucilago:		2L
Muestra		Tiempo (horas)	° Brix	Antiespum (ml)	Titulación (ml)	Promedio (ml)	C. Alcohol (g/l)
0	1	0	17	-	1,900	1,917	0
	2				1,950		
	3				1,900		
1	1	2	16	-	1,800	1,817	5,755
	2				1,850		
	3				1,800		
2	1	6	14	10	1,700	1,717	11,510
	2				1,750		
	3				1,700		
3	1	11,5	10	5	1,650	1,633	16,306
	2				1,650		
	3				1,600		
4	1	24	6	5	1,450	1,483	24,938
	2				1,500		
	3				1,500		
Productividad							1,039

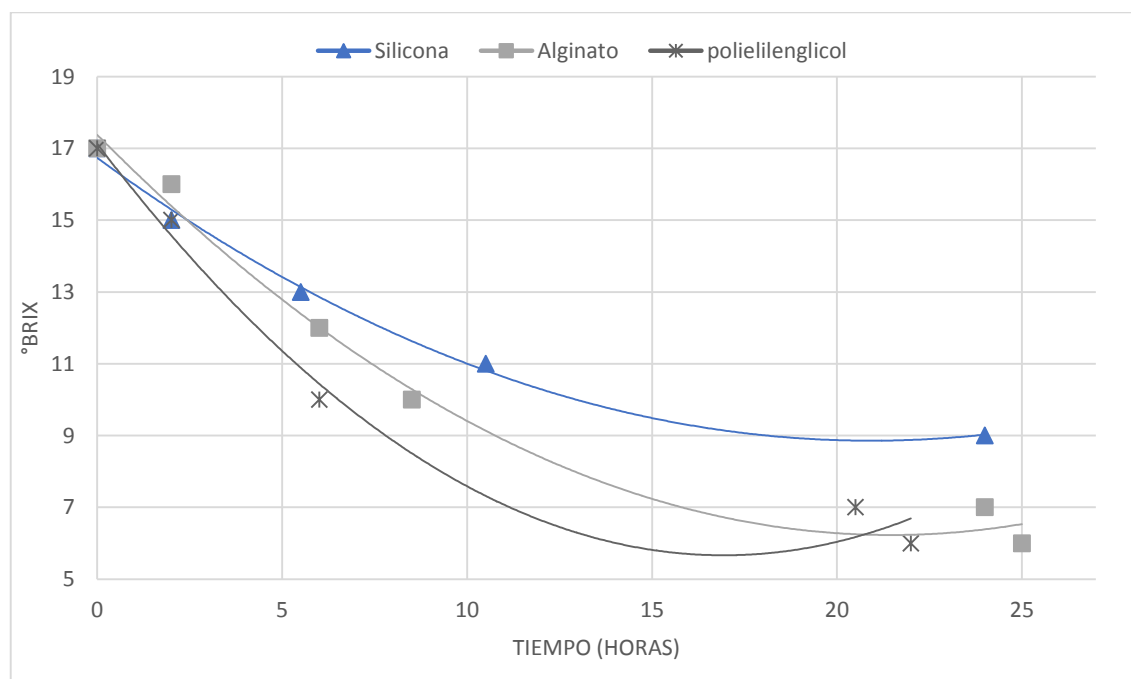


Ilustración 33. Resultados obtenidos en la fermentación alcohólica, consumo de grados Brix en función del tiempo, comparación en las tres experimentaciones

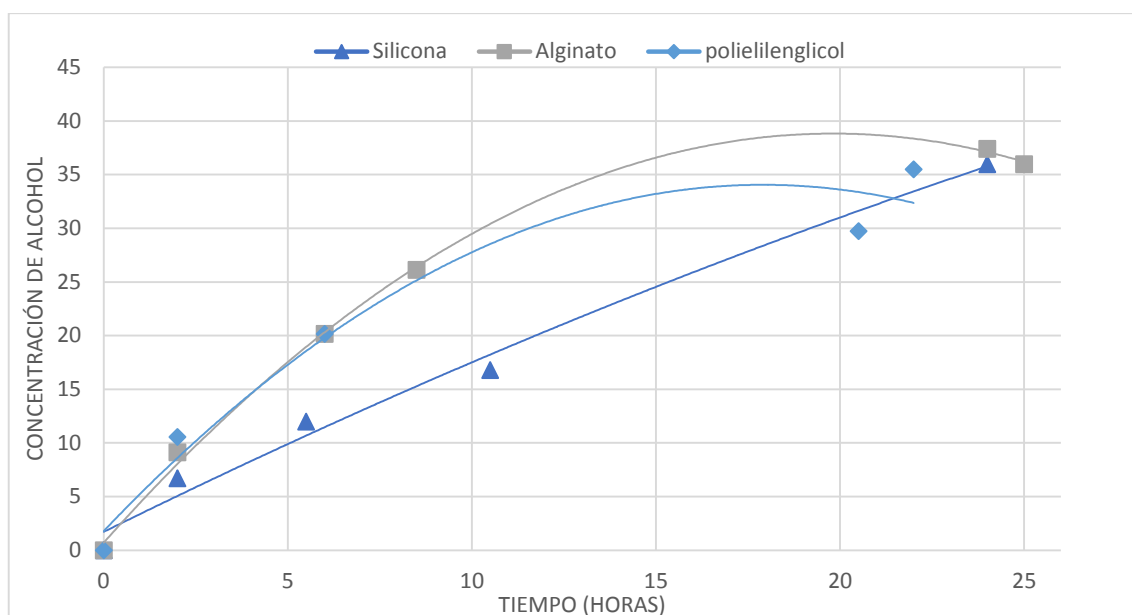


Ilustración 34. Resultados obtenidos en la fermentación alcohólica, Producción de bioetanol en función del tiempo, comparación en las tres experimentaciones

Tabla 20. Resultados obtenidos para la eliminación de espuma en la fermentación alcohólica con el uso de aceite siliconado como antiespumante

Experimento 1		
Antiespumante:		Aceite Siliconado
Tiempo (min)	Espuma (ml)	Antiespumante (ml)
0	413,512	0
10	275,675	5
15	275,675	10
30	275,675	10
60	206,756	10
330	137,837	13
1110	68,919	13
1140	68,919	18
1170	17,230	18

Tabla 21. Resultados obtenidos para la eliminación de espuma en la fermentación alcohólica con el uso de alginato de sodio como antiespumante

Experimento 2		
Antiespumante:		Alginato de sodio
tiempo (min)	Espuma (ml)	antiespumante (g)
0	385,945	0
10	137,837	6
20	13,784	12
1080	137,800	17,5
1090	13,800	22,5
1100	13,800	22,5

Tabla 22. Resultados obtenidos para la eliminación de espuma en la fermentación alcohólica con el uso de Polietilenglicol como antiespumante

Experimento 3		
Antiespumante:		Polietilenglicol
tiempo (min)	Espuma (ml)	Antiespumante (ml)
0	413,512	0
10	137,837	10
900	137,837	10
910	137,837	20
970	17,230	20

ANEXO IV. Datos obtenidos en la experimentación con 20g/L de levadura

Saccharomyces cerevisiae

Tabla 23. Resultados obtenidos para la concentración de bioetanol en la fermentación alcohólica con Polietilenglicol como antiespumante

Experimento 1							
		Antiespumante:		Polietilenglicol	Volumen de mucilago:		2L
Muestra		Tiempo (horas)	° Brix	Antiespum (g)	Titulación (ml)	Promedio (ml)	C. Alcohol (g/l)
0	1	0	17	-	2,000	1,983	0,0000
	2				2,025		
	3				1,925		
1	1	2	15	5	1,800	1,733	7,194
	2				1,650		
	3				1,750		
2	1	6	10	5	1,150	1,167	23,500
	2				1,250		
	3				1,100		
3	1	11	7	10	0,850	0,675	37,647
	2				0,625		
	3				0,550		
4	1	24	7	-	1,000	1,017	27,816
	2				1,000		
	3				1,050		
Productividad							3,422

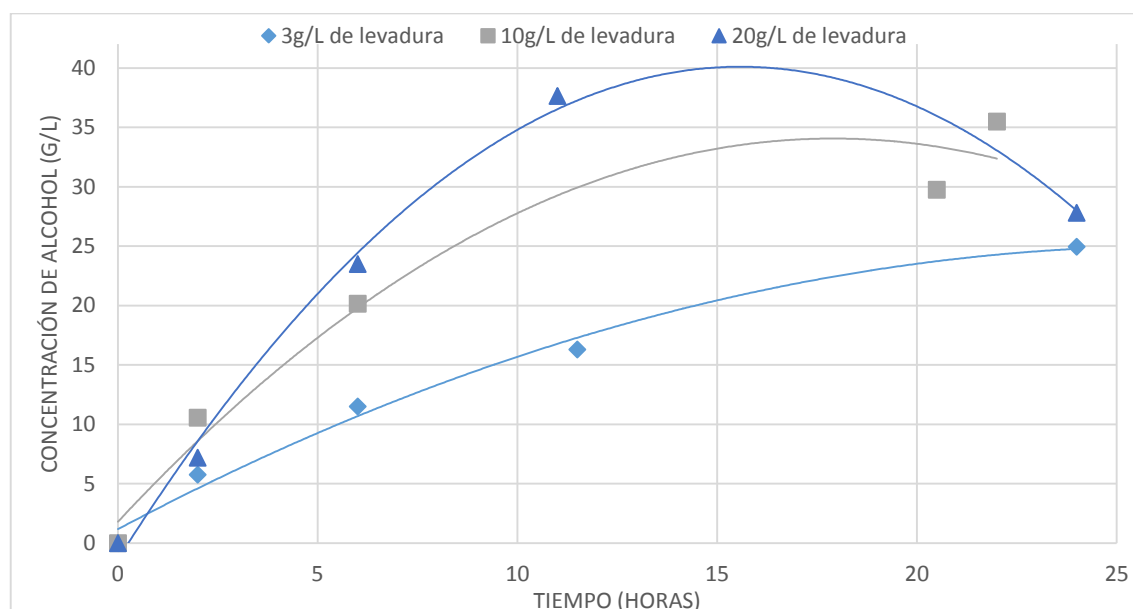


Ilustración 35. Resultados obtenidos en la fermentación alcohólica anaerobia, comparación de la obtención de bioetanol en función del tiempo con el uso de Polietilenglicol como antiespumante con diferentes concentraciones de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

ANEXO V. Registros fotográficos recolección de materia prima y extracción del mucilago de cacao



Ilustración 36. Punto de recolección del cacao



Ilustración 37. Concentrado, Esterilización y evacuado del mucilago de Cacao CCN-51.

ANEXO VI. Registro fotográfico de la fermentación en el Biorreactor tipo Batch

Ilustración 38. Vista superior, vista frontal y panel de control del reactor tipo Batch



Ilustración 39. Antiespumantes utilizados en la fermentación alcohólica anaerobia: Aceite Siliconado, Alginato de Sodio y Polietilenglicol

ANEXO VII. Registro fotográfico del método de Winnick para la determinación de alcohol en las muestras

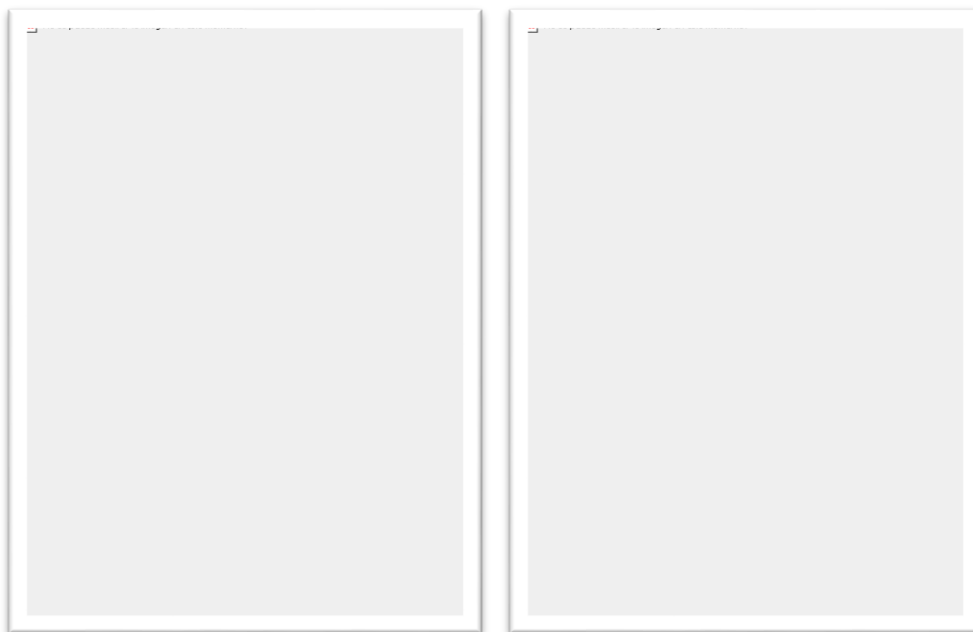


Ilustración 40. Centrifugado de las muestras de mucilago de cacao CCN-51



Ilustración 41. Descongelado de las muestras que se mantenían en nitrógeno líquido



Ilustración 42. Rotulación de las muestras y proceso de secado a 50°C durante 2 horas

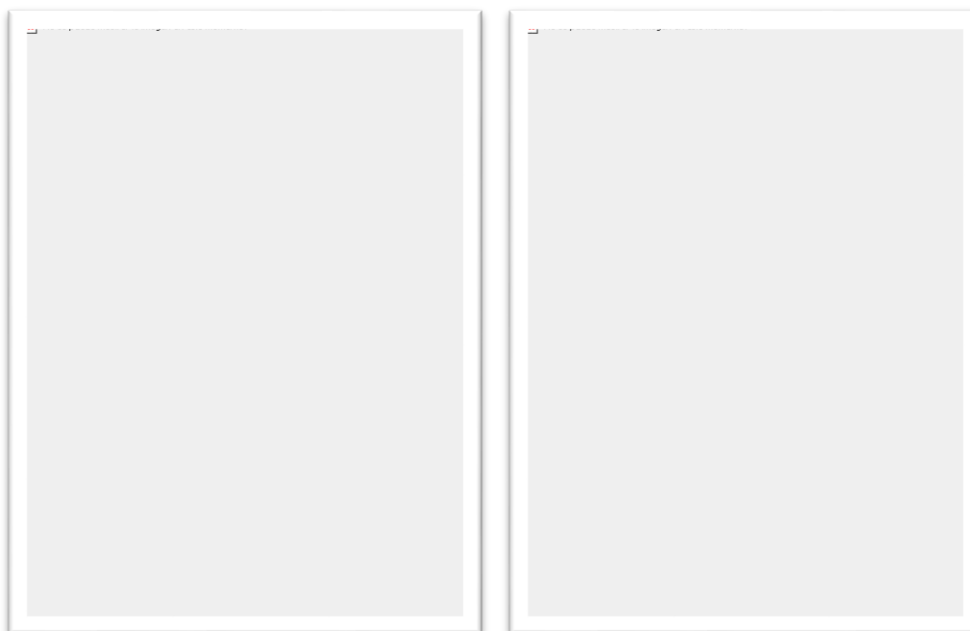


Ilustración 43. Valoración con tiosulfato de sodio 0,1N, cambio de color para determinar el viraje.

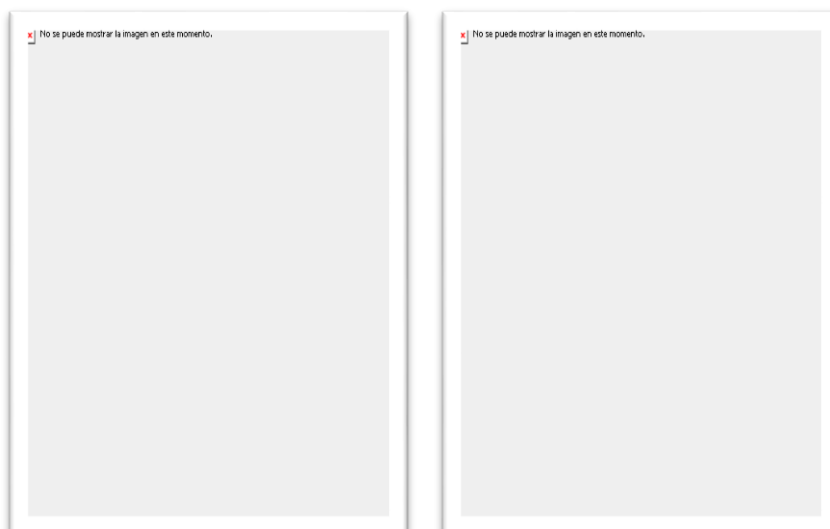
ANEXO VIII. Registro fotográfico de la formación y eliminación de espuma con los diferentes antiespumantes



*Ilustración 44. Cambio en el nivel de espuma con concentración de 10g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando aceite siliconado como antiespumante*



*Ilustración 45. Cambio en el nivel de espuma con concentración 10g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando alginato de sodio como antiespumante*



*Ilustración 46. Cambio en el nivel de espuma con concentración 10g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando Polietilenglicol como antiespumante*



*Ilustración 47. Cambio en el nivel de espuma con concentración 20g/L de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando Polietilenglicol como antiespumante*